

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Bestimmung mikrobieller und gewebeeigener Lipasen mit dem
Reflectoquant[®] Lipase – Test (Merck KGaA)**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Susanne Büchner
aus Gotha

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuerin: PD Dr. Peggy Braun

Gutachter: PD Dr. Peggy Braun
Institut für Lebensmittelhygiene
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Georg Schiefer
Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt der Stadt Leipzig
Prof. Dr. Manfred Gareis
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie und Toxikologie
Kulmbach

Tag der Verteidigung: 26. Juni 2007

In Gedenken an meinen Vater
Arwen Büchner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Zusammensetzung der Fette in Lebensmitteln tierischer Herkunft.....	3
2.2	Verderb in Lebensmitteln tierischer Herkunft.....	6
2.2.1	Allgemeines.....	6
2.2.2	Fleisch.....	8
2.2.3	Wurstwaren.....	11
2.2.4	Fisch.....	13
2.3	Nachweismethoden für den Verderb	14
2.4	Lipasen (Triacylglycerolester – Hydrolasen, EC 3.1.1.3).....	17
2.4.1	Gewebslipasen.....	19
2.4.1.1	Lipoproteinlipase (LPL).....	20
2.4.1.2	Hormonsensitive Lipase (HSL, neutrale Lipase)	21
2.4.1.3	Monoacylglycerol – Lipase.....	21
2.4.1.4	Lysosomale Lipase (saure Lipase)	21
2.4.1.5	Hepatische Triglyceridlipase (HTGL)	22
2.4.2	Mikrobielle Lipasen.....	22
2.4.2.1	Gattung <i>Pseudomonas</i>	22
2.4.2.2	Gattung <i>Bacillus</i>	24
2.4.2.3	Gattung <i>Staphylococcus</i>	26
2.4.2.4	Gattung <i>Aeromonas</i>	27
2.4.2.5	Gattung <i>Serratia</i>	29
2.4.2.6	Gattung <i>Proteus</i>	29
2.5	Industrielle Anwendung von Lipasen	30
2.6	Methoden zur Bestimmung von Lipaseaktivitäten	31
3	Material und Methoden.....	35
3.1	Voruntersuchungen	36
3.1.1	Reflectoquant® – Lipase – Test (Merck KGaA, Darmstadt)	36
3.1.2	Eignungsprüfung des Reflectoquant® – Lipase – Tests zur Messung bakterieller Lipasekonzentrationen in Nährbouillon.....	37
3.1.3	Entwicklung von Applikationsvorschriften für den Einsatz des Reflectoquant® Lipase – Tests zur Untersuchung von Lipasekonzentrationen in ausgewählten Lebensmitteln tierischer Herkunft.....	39
3.1.3.1	Fleisch (Schweine-, Rind-, Hähnchen- und Kaninchenfleisch)	39

3.1.3.2	Fisch (Kabeljau, Forelle, Hering).....	43
3.1.3.3	Leber.....	44
3.1.3.4	Wursterzeugnisse (Brühwurst, Kochwurst, Rohwurst).....	45
3.1.4	Ergebnisse der Voruntersuchungen	49
3.2	Hauptuntersuchungen.....	51
3.2.1	Bestimmung bakterieller Lipasen.....	51
3.2.1.1	Untersuchungsmaterial	51
3.2.1.2	Synthese bakterieller Lipasen	52
3.2.1.3	Messung bakterieller Lipasekonzentrationen in Bouillon.....	52
3.2.1.4	Bestimmung der Hitzestabilität bakterieller Lipasen mit dem Reflectoquant® Lipase - Test.....	53
3.2.1.5	Ringagardiffusionstest (RAD – Test)	53
3.2.1.6	Vergleich der Substratverwertbarkeit verschiedener bakterieller Lipasen	54
3.2.2	Bestimmung gewebseigener Lipasen.....	55
3.2.2.1	Untersuchungsmaterial	55
3.2.2.2	Probennahme und Extraktgewinnung zur Bestimmung gewebseigener Lipasen	56
3.2.2.3	Messung von Lipasen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs	56
3.2.2.4	Bestimmung der Hitzestabilität der Lipasen in den Gewebeextrakten mit dem Reflectoquant® Lipase – Test.....	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Bakterielle Lipasekonzentrationen	57
4.2	Gewebseigene Lipasekonzentrationen.....	62
4.3	Hitzestabilität bakterieller und gewebseigener Lipasen	66
4.4	Vergleich der Substratverwertung durch verschiedene bakterielle Lipasen.....	68
5	Diskussion	73
6	Zusammenfassung.....	91
7	Summary.....	93
8	Literaturverzeichnis.....	95
	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aeromonas
Aqua dest.	Aqua destilata
B.	Bacillus
d.h.	das heißt
GKZ	Gesamtkeimzahl
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
KbE	Koloniebildende Einheit
P.	Proteus
Ps.	Pseudomonas
S.	Staphylococcus
Ser.	Serratia
spp.	Spezies (Plural)
z.T.	zum Teil
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Thematik der Haltbarkeit und des Verderbs von Lebensmitteln blieb über die letzten Jahre von ungebrochener Aktualität. Die Haltbarkeit eines Lebensmittels ist ein wichtiges Kriterium zur Qualitätsbewertung geworden und umfasst die physiko - chemische, biochemische, mikrobiologische, sensorische und nährwertmäßige Stabilität eines Produktes (THIEMIG et al. 1998). Die erheblichen Distanzen, welche die verschiedensten Lebensmittel vom Hersteller bis zum Verbraucher zurücklegen, verdeutlichen, welche Rolle die Haltbarkeit bzw. Verderbnisprozesse spielen. Die Gewinnung und der Transport sollen dabei unter optimalen hygienischen und klimatischen Bedingungen erfolgen, um bis zum Verbraucher höchste Qualität und Sicherheit zu gewährleisten. Hinzu kommt der Wunsch vieler Verbraucher nach möglichst „natürlichen“ Lebensmitteln, die weitgehend ohne Zusatz- und Konservierungsstoffe sowie spezielle Behandlungsmethoden hergestellt werden. Dies hat jedoch zur Folge, dass mikrobielle und enzymatische Vorgänge oft nur unzureichend unterdrückt werden. 1/3 der Weltproduktion, so schätzt man, gehen aufgrund mikrobiellen Verderbs verloren (LUND 2000). Diese Größenordnung macht die ökonomische Relevanz der Haltbarkeitsproblematik bewusst.

Um den Sicherheitsbedürfnissen der Verbraucher und geltenden Rechtsnormen gerecht zu werden, sind Kontrollmethoden für die Überprüfung der Qualität notwendig. In diesem Zusammenhang kommen bisher routinemäßig die mikrobiologische Untersuchung, d.h. die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl sowie die sensorische Untersuchung der Lebensmittel zum Einsatz. Diese Methoden setzen jedoch große Erfahrungen der Untersucher voraus und sind z.T. sehr zeitaufwändig und kostenintensiv. Besonders die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung sind zudem von den eingesetzten Nährböden, der Bebrütungstemperatur und –zeit abhängig. Außerdem werden nicht alle Verderbnisprozesse, insbesondere der Einfluss von Enzymen, mit diesen Methoden erfasst (BRAUN 2003). Deshalb werden ergänzend immer wieder neue Methoden zur Charakterisierung der Qualität bzw. zum Nachweis von Verderbniserscheinungen publiziert. Besonders analytische Verfahren in Form von Schnellmethoden spielen angesichts der größeren Bedeutung, die der betrieblichen Eigenkontrolle heute zugemessen wird, eine zunehmend wichtigere Rolle.

Die eigene Arbeit widmet sich den Untersuchungen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test, einem für die Messung von Milchlipasen konzipierten Schnelltest der Firma Merck KGaA. Lipaseaktivitäten führen, als wesentlicher Bestandteil des komplexen Verderbnisprozesses, zu einer Beeinträchtigung der Qualität in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Die Erfassung bakterieller und gewebeeigener Lipasen ist ein Beitrag zum besseren Verständnis lipolytisch bedingter Veränderungen in diesen Lebensmitteln und stellt eine neue Methode dar, die

möglicherweise eine exaktere Einschätzung der Qualität verschiedener Lebensmittel tierischer Herkunft erlaubt. Neben diesen Anwendungsmöglichkeiten des Reflectoquant® Lipase – Tests sollten erstmals Richtwerte von gewebeeigenen Lipasekonzentrationen in den entsprechenden Lebensmitteln erstellt werden. Weiterhin wurde das Verhalten bakterieller und gewebeeigener Lipasen unter Hitzeeinwirkung untersucht, um eine Unterscheidung dieser voneinander zu ermöglichen.

2 Literatur

2.1 Zusammensetzung der Fette in Lebensmitteln tierischer Herkunft

Fette sind in Pflanzen und Tieren in freier Form oder als Zellbestandteile weit verbreitet und spielen für die Ernährung eine bedeutende Rolle. Fisch und Fleisch sowie Wursterzeugnisse enthalten unterschiedlich große Fettanteile, welche die Qualität und den Genußwert der entsprechenden Erzeugnisse entscheidend bestimmen (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992).

Fett liegt in Lebensmitteln hauptsächlich in Form von Triglyceriden vor, die, chemisch gesehen, Ester aus Glycerol und Fettsäuren darstellen. Die Eigenschaften der Triglyceride werden durch die veresterten Fettsäuren bestimmt, so führt z.B. ein hoher Gehalt an ungesättigten Fettsäuren zu einer Erniedrigung des Schmelzpunktes der Triglyceride. Tierische Fette enthalten hauptsächlich gesättigte oder ungesättigte, unverzweigte aliphatische Monocarbonsäuren mit gerader Kohlenstoffanzahl von C2 bis C18. Besonders häufig treten die gesättigten Fettsäuren Palmitin- (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) und die ungesättigten Fettsäuren Öl- (C18:1), Linol- (C18:2) und Linolensäure (C18:3) auf (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992). Ein hoher Gehalt an ungesättigten Fettsäuren ist ernährungsphysiologisch günstig, jedoch werden sensorische und physikalische Eigenschaften des Fleisches und deren Produkte sowie die Haltbarkeit, bedingt durch die Oxidationsfreudigkeit ungesättigter Fettsäuren, nachteilig beeinflusst (REMER et al. 2000). Die Zusammensetzung des tierischen Fettes wird durch Tierart, Rasse, Geschlecht, Alter, Kondition bzw. durch Ernährung, Haltungsform, Klima und andere Umweltfaktoren beeinflusst (HERNÁNDEZ et al. 1998). Fett kann in Form von subkutanem, intermuskulärem, intramuskulärem und Körperhöhlenfett im tierischen Organismus vorliegen.

In konzentrierter Form treten Fette im reinen **Fettgewebe von Tieren** (subkutanes Fett bzw. Körperhöhlenfett) auf. Für die menschliche Ernährung werden die Fette bzw. Öle von Rind, Schwein und Schaf sowie von Geflügel und Fisch genutzt. Neben der Deckung des Energiebedarfs spielen Fette eine große Rolle bei der Versorgung des Organismus mit essentiellen Fettsäuren, fettlöslichen Vitaminen und verschiedenen Aromastoffen (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992).

Nach verschiedenen Be- und Verarbeitungsprozessen werden aus den entsprechenden Fettgeweben z.B. Räucherspeck, Schweine- und Gänseschmalz, Rinder- bzw. Schaftalg oder Fischöle bzw. -trane gewonnen.

Der Rückenspeck vom Schwein besteht zu 38,7 % aus gesättigten Fettsäuren. Der Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren beträgt 48,7 % und an mehrfach ungesättigten 12,6 % (HARTMANN et al. 1997).

Entgegen der Meinung vieler Verbraucher ist durch Einführung moderner Zucht- und Fütterungstechniken auch **Schweinefleisch** zu einer ernährungsphysiologisch wertvollen Quelle für mehrfach ungesättigte Fettsäuren geworden (MORGAN et al. 1992). Der durchschnittliche Fettgehalt im Fleisch aus der Nuss, im Schnitzelfleisch und Steakfleisch beträgt 1,3 %, 1,9 % bzw. 2,1 % (HONIKEL und WELLHÄUSER 1993 a). Den Gesamtanteil an ungesättigten Fettsäuren im intramuskulären Fett geben EIKELENBOOM et al. (1996) mit 53 % an. HERNÁNDEZ et al. (1998) untersuchten verschiedene Muskeltypen in Schweinefleisch und fanden heraus, dass der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in oxidativen Muskeln höher ist als in glykolytischen. Besonders stark vertretene Fettsäuren sind, wie schon erwähnt, Palmitin- (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) und die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (C18:1), Linol- (C18:2) und Arachidonsäure (C20:4).

Der durchschnittliche Fettgehalt von verschiedenen **Rindfleischstücken** wurde von HONIKEL und WELLHÄUSER (1993 b) wie folgt angegeben: Hüfte 1,45 bis 2,8 g/100 g, Oberschale 1,35 bis 3,5 g/100 g, Unterschale 0,55 bis 6,1 g/100 g und Hochrippe 3,3 bis 13,35 g/100 g. Auch beim Rindfleisch wird durch Fütterung von Gras und Ölsamen, die eine hohe Konzentration an Linolensäure (C18:3), Linolsäure (C18:2) und Ölsäure (C18:1) aufweisen, ein immer höherer Gehalt an ungesättigten Fettsäuren angestrebt. Das intramuskuläre Fett in Rindfleisch besteht zu ca. 47 % aus gesättigten Fettsäuren, besonders Stearinsäure (C18:0). Einfach ungesättigte Fettsäuren machen einen Anteil von ca. 42 % und die mehrfach ungesättigten Fettsäuren von 4 % aus (SCOLLAN 2003). Aus der Klasse der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Rindfleisch sind die Omega - 3 - Fettsäuren α - Linolensäure (C18:3), Eicosapentaensäure (C20:5) und Docosahexaensäure (C22:6) vertreten (SCOLLAN 2003).

Kaninchen- und Geflügelfleisch weisen natürlicherweise einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren auf. Besonders stark vertreten sind Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2) sowie die gesättigte Palmitinsäure (C16:0) (HERZOG 1994, JAHAN et al. 2004). Der Gesamtfettgehalt liegt für Kaninchen bei 3 bis 6 % und für Hähnchenfleisch bei 9,6 % (HERZOG 1994, POLAK et al. 2006). Nach JAHAN et al. (2004) betrug der Fettgehalt in Hühnerbrust zwischen 0,78 und 1,58 %. Der Anteil an mehrfach ungesättigten Omega - 3 - Fettsäuren lag zwischen 2,1 und 6,3 %. Die einfach ungesättigten Fettsäuren wurden dominiert von Ölsäure (C18:1) gefolgt von Palmitoleinsäure (C16:1). HONIKEL und KLÖTZER (1996) analysierten den Fettgehalt in der Oberkeule von Brathähnchen mit $6,55 \pm 1,95$ g/100 g.

Die Fettzusammensetzung von Kaninchenfleisch wurde von POLAK et al. (2006) untersucht. Kaninchenfleisch enthält danach durchschnittlich 40,9 % gesättigte Fettsäuren, 34,1 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 25,41 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren.

Auch **Fische** sind für einen besonders hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren bekannt [z.B. Kabeljau 48 %, Regenbogenforelle 55 % (SHEWFELT 1981)]. Sie können beispielsweise nach ihrem Fettgehalt eingeteilt werden (siehe Tabelle 1). Der Fettgehalt und die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Fischarten schwankt jedoch sehr stark, da eine Abhängigkeit vom biologischen Reifezustand, der Futterzusammensetzung bzw. dem – angebot, dem Fangplatz, der Gewässertemperatur und dem Salzgehalt des Gewässers besteht .

Tabelle 1: Einteilung der Fische nach ihrem Fettgehalt (FRANZKE 1996)

Einteilung	Fettgehalt	Beispiel
Magerfische	< 1 %	Kabeljau
Fische mit geringem Fettgehalt	>1-5 %	Forelle
Fettfische	>10 %	Hering

Magerfische besitzen einen hohen Anteil an polaren Lipiden (Phosphatidylcholine) und speichern ihre Fette zum großen Teil in der Leber. Fettfische dagegen weisen einen höheren Gehalt an neutralen Lipiden (Triglyceride) auf und speichern ihr Fett in der Muskulatur (HUSS 1995, FRANZKE 1996). Hinsichtlich der Fischmuskulatur werden zwei Typen unterschieden – weißes und dunkles Fischmuskelgewebe. In der dunklen Muskulatur stellen Triglyceride die Hauptenergiequelle dar, während Glycogen die Energiereserve der weißen Muskulatur darstellt (SHEWFELT 1981, HUSS 1995). Einige Fische wie Lachs, Forelle und Karpfen weisen eine intermediäre Muskulatur auf, die sowohl dunkle als auch weiße Fasertypen enthält (SHEWFELT 1981).

Der durchschnittliche Gehalt an gesättigten Fettsäuren in Fisch beträgt 15 - 25 %, der an einfach ungesättigten 35-60 % und der an mehrfach ungesättigten 25 - 40 %, wobei Omega-3 – Fettsäuren besonders stark vertreten sind.

Aufgrund der beschriebenen physiologischen Fettbeschaffenheit sind Fische besonders anfällig für Qualitätsminderungen durch Lipolyse, selbst in gefrorenen Produkten, wie viele Publikationen bestätigen (REICHSTEIN und PRIEBE 1968, BOSUND und GARNOT 1969 b; GEROMEL und MONTGOMERY 1980).

2.2 Verderb in Lebensmitteln tierischer Herkunft

2.2.1 Allgemeines

Grundsätzlich unterliegen Lebensmittel vom Zeitpunkt ihrer Gewinnung bzw. Herstellung an ständigen Veränderungen. Von Verderb spricht man jedoch erst dann, wenn sich Lebensmittel so stark verändern, dass sich die Verwendbarkeit für den menschlichen Genuss bedeutend verringert oder ganz ausgeschlossen werden muss (HAYES 1985).

Besonders Lebensmittel tierischer Herkunft stellen aufgrund ihres hohen Protein- und Fettgehaltes, des neutralen bis leicht sauren pH – Wertes und des hohen Feuchtigkeitsgehaltes empfindliche Lebensmittel dar (HUIS IN'T VELD 1996). Eine Vielzahl von mikrobiellen, chemischen, physikalischen und enzymatischen Vorgängen führt zu Veränderungen der Eigenschaften dieser Lebensmittel. Einige sind erwünscht und beeinflussen z.B. die Fleischreifung bzw. werden industriell zur Herstellung verschiedenster Wursterzeugnisse und Käsesorten genutzt. Viele dieser Prozesse führen jedoch ab einem bestimmten Zeitpunkt zu einem Qualitätsverlust dieser Produkte.

In frischen fetthaltigen Lebensmitteln wird Verderb primär durch mikrobielles Wachstum und lipolytische Enzymaktivitäten verursacht. Zu den damit verbundenen Verderbniserscheinungen gehören pH – Änderungen, das Auftreten unangenehmer Gerüche, Geschmacksveränderungen, Änderungen in Konsistenz und Textur, Farbstoffbildung sowie Gas- und Schleimbildung (HUIS IN'T VELD 1996, BRAUN 2005). Unter Umständen kann es auch zur Bildung gesundheitsgefährdender toxischer Verbindungen kommen (HUIS IN'T VELD 1996).

Psychrotrophe Keime, d.h. Bakterien, die sich auch bei Kühltemperaturen bis zu $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ vermehren können, stehen beim Lebensmittelverderb in den Industrieländern im Vordergrund (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992). Typische Vertreter der Verderbnisflora auf Lebensmitteln tierischer Herkunft sind *Pseudomonas*-, *Aeromonas*-, *Acinetobacter*-, *Lactobacillus*-, *Streptococcus* - Arten sowie Vertreter der *Enterobacteriaceae*. Als lipolytisch besonders aktiv werden Keime folgender Gattungen beschrieben: *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Clostridium* sowie Schimmelpilze und Hefen (FEHLHABER und SCHEIBNER 1974, SINGH et al. 1976, ANDERSSON 1980, STEAD 1986, HECHELMANN und KASPROWIAK 1991). Viele dieser Keime gehören in geringer Zahl zur Normalkeimflora von Lebensmitteln.

Die Vermehrung von Mikroorganismen wird durch folgende Faktoren beeinflusst (MOSSEL et al. 1995, HEESCHEN 2005):

- intrinsic factors - Eigenschaften des Lebensmittels wie z.B. Nährstoffangebot, Zerkleinerungsgrad, a_w , pH- und Eh – Wert, antimikrobielle Substanzen oder strukturelle Hindernisse
- extrinsic factors – äußere Einflüsse wie z.B. Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit, Zusammensetzung der Gasatmosphäre
- implicit factors – bakterielle Eigenschaften, z.B. Synergismen und Antagonismen der Mikroflora bei der Konkurrenz um Nährstoffe sowie spezifische Wachstums-eigentümlichkeiten
- processing factors – lebensmitteltechnologische Verfahren, die Einfluss auf die Mikroflora haben (Erhitzen, Säuern, Trocknen, Salzen, Vakuumverpackung).

Für Lebensmittel tierischer Herkunft wird weiterhin, neben der Oxidation, immer wieder die Fetthydrolyse als eine der Hauptursachen von Verderb genannt. Sie wird durch mikrobielle und gewebeigene Lipasen hervorgerufen, die Triglyceride zu Glycerol, Mono- und Diglyceriden sowie freien Fettsäuren hydrolysieren. Die „natürliche“ Aufgabe bakterieller Lipasen besteht darin, nichtresorbierbare Stoffe in für die Bakterienzelle resorbierbare und nutzbare zu überführen. Erste Enzymaktivitäten werden in der Regel bei Keimzahlen von 10^7 KbE/ml bzw. g nachgewiesen (BRAUN 2005).

Gewebeigene Lipasen dienen im lebenden Organismus dem Fettstoffwechsel und sind auch nach dessen Tod noch aktiv. Die entstandenen freien Fettsäuren beeinflussen entweder selbst die sensorische Qualität der Lebensmittel oder stellen Ausgangsstoffe für die Oxidation dar. Durch Autoxidation (Fotooxygenierung) oder Lipoxygenasen werden die Fettsäuren zu den geruchs- und geschmacksneutralen Hydroperoxiden oxidiert und weiter zu Alkoholen, Alkenen, Alkanen, Aldehyden, Ketonen und Säuren umgesetzt, die geruchlich und geschmacklich relevant sind (MONTEL et al. 1998). Sensorische Wertminderungen werden auch durch Carbonylverbindungen und niedermolekulare freie Fettsäuren hervorgerufen. So verursachen kurzkettige Fettsäuren [Butter- (C4) bis Laurinsäure (C12)], bedingt durch einen niedrigen Schwellenwert, einen unreinen, alten und scharfen Geschmack. Für einen seifigen Geschmack werden hauptsächlich Kaprin- (C10) und Laurinsäure verantwortlich gemacht (AL-SHABIBI et al. 1962; KIRST et al. 1983). Unangenehme Geruchs- und Geschmacksveränderungen werden auch als off-flavour bzw. off-odour bezeichnet oder unter dem Begriff der Ranzidität zusammengefasst. Der Bereich unterhalb des off-flavours ist Bestandteil des Aromas von Lebensmitteln (FRANZKE 1996).

Eine Sonderform der Fettveränderung stellt die Methylketonbildung durch Mikroorganismen dar. Sie wird auch als Parfümranzigkeit bezeichnet. Nach Freisetzung von Fettsäuren durch mikrobielle Lipasen kommt es zu einem desmolytischen Abbau speziell der gesättigten Fettsäuren zu Methylketonen, die sehr geruchs- und geschmacksintensiv sind. In

wasserhaltigen Fetten, wie Butter und Margarine, die Cocos- bzw. Palmkernfett enthalten, führen sie zu einer Wertminderung der Erzeugnisse, während sie in der Käseherstellung (z.B. Roquefort) erwünscht sind (FRANZKE 1996).

Je nach Lebensmittel variieren die Flora und Verderbnisprozesse der entsprechenden Produkte. Daher werden die wichtigsten Lebensmittel tierischer Herkunft in den folgenden Kapiteln einzeln besprochen.

2.2.2 Fleisch

Hygienisch gewonnenes Fleisch von gesunden Tieren ist in der Regel im Inneren keimfrei. Auf der Fleischoberfläche existiert jedoch eine so genannte fleischspezifische Mischflora, die entweder aus dem Tierkörper selbst stammt, vom Menschen auf das Fleisch übertragen werden kann oder aus der Umgebung auf das Fleisch gelangt. Vertreter dieser Mischflora sind Enterokokken, *Enterobacteriaceae*, Laktobazillen, aerobe Sporenbildner bzw. Mikro-, Staphylo- und Streptokokken, *Pseudomonas spp.* sowie *Aeromonas spp.*, Hefen und Schimmelpilze (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992). GILL (1982) erwähnt zusätzlich noch *Acinetobacter*, *Alteromonas putrefaciens* und *Brochothrix thermosphacta* als wichtige Verderbniserreger. BAUMGART (1999) zählt auch *Shewanella putrefaciens* und Arten von *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Carnobacterium* und *Leuconostoc* zu den häufig vorkommenden Mikroorganismen in nicht vakuumverpacktem Fleisch. 66,8 % der nachweisbaren Keime sind *Pseudomonas spp.* (CHANDRAN et al. 1986). Da sie zu den psychrophilen Bakterien gehören, finden sie auf kühlgelagertem Fleisch optimale Wachstumsbedingungen. Außerdem sind sie in der Lage, durch die Bildung von Bakteriozinen das Wachstum anderer Bakterien einzuschränken bzw. diese abzutöten (ZICKRICK 1986, GRAM 2002). Zu ihren Stoffwechselleistungen zählen ebenfalls die Synthese von Lipasen und Proteasen, die durch Abbau von Muskel- und Fettgewebe zum Verderb führen können.

In vakuumverpacktem Fleisch liegt, bedingt durch den Sauerstoffmangel, eine andere Zusammensetzung der Verderbnisflora vor. Pseudomonaden, Hefen und Schimmelpilze sind unter diesen Bedingungen kaum vermehrungsfähig. Fakultativ anaerobe Bakterien wie z.B. *Brochothrix thermosphacta*, Milchsäurebakterien, kältetolerante *Enterobacteriaceae* wie *Serratia spp.*, *Streptococcus*- und *Bacillus* - Arten sowie *Clostridien*, *Shewanella putrefaciens*, Carnobakterien und *Leuconostoc spp.* überwiegen (SMULDERS und VAN LAACK 1992, BEM und HECHELMANN 1994, KREYENSCHMIDT 2003). Zahlenmäßig am stärksten vertreten sind Laktobazillen und *Brochothrix thermosphacta*.

Von Geflügelschlachtkörpern werden vorwiegend *Acinetobacter*- und *Pseudomonas* – Arten, *Enterobacteriaceae* sowie Hefen isoliert. In geringerer Zahl kommen *Aeromonas spp.* und Vertreter der Familie der *Micrococcaceae* und *Lactobacillaceae* vor (GALLO et al. 1988,

BEM und HECHELMANN 1994, SAMELIS 2006). GALLO et al. (1988) wiesen auf 34 % der frisch geschlachteten Geflügelfleischproben Mikrokokken nach. Weiterhin wurden Corynebakterien auf 24 %, Laktobazillen und *Enterobacteriaceae* auf je 16 % der Proben detektiert. Als bedeutende und häufig vorkommende Keime werden weiterhin *Brochothrix thermosphacta* und *Shewanella putrefaciens* erwähnt (SAMELIS 2006). *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas putida* dominieren nach den ersten Tagen der Lagerung (GALLO et al. 1988).

Bei der soeben beschriebenen Zusammensetzung der Keimflora von Fleisch handelt es sich um die Normalkeimflora, die zu erwarten ist, aber noch nicht mit Verderbniserscheinungen einhergeht. Durch das Zusammenspiel von den im allgemeinen Teil genannten Faktoren, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, pH – Wert, Nährstoffangebot etc., wird die Vermehrung der Keimflora bestimmt und somit die Haltbarkeit. BEM und HECHELMANN (1994) verglichen z.B. die Haltbarkeit von Schlachtgeflügel bei verschiedenen Lagertemperaturen. Bei einer Temperatur von 0 °C kam es nach zwölf Tagen zu Verderbniserscheinungen, bei 4 °C war dies bereits nach sechs Tagen der Fall. Eine weitere Erhöhung der Lagerungstemperatur auf 10 °C hatte eine Verkürzung der Haltbarkeit auf zwei Tage zur Folge.

Die Haltbarkeit von Schweine – bzw. Rindfleisch beträgt in der Fleischindustrie (schnellgekühltes Fleisch) bei einer Kerntemperatur von 0 - 1 °C acht bis zehn Tage bzw. zwei bis drei Wochen (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992). Unter den Lagerungsbedingungen im Haushalt (Kühlschrank) hält sich Rindfleisch drei bis vier Tage lang, Kalbs- und Schweinefleisch dagegen nur zwei bis drei Tage (ANON. 2007).

Für die Lagerfähigkeit von tiefgeköhltem Fleisch bzw. Fleischerzeugnissen spielen ungesättigte Fettsäuren eine besondere Rolle. Wie im vorhergehenden Kapitel „Zusammensetzung der Fette in Lebensmitteln tierischer Herkunft“ erläutert, wird durch entsprechende Fütterung ein möglichst hoher Anteil an ungesättigten Fettsäuren in Schweine- und Rindfleisch angestrebt. Bei Gefrierlagerung kann dies jedoch zu massiven Aromaabweichungen führen (FISCHER und KRATZ 1999). Zwar werden biochemische Prozesse durch das Tiefgefrieren stark reduziert, aber nicht gestoppt. Daher wird auch bei sachgemäßer Lagerung die maximale Lagerfähigkeit durch Fettverderb und Farbveränderungen begrenzt (STIEBING und HEGERDING 2004). In Tabelle 2 sind die Gefrierlagerungszeiten verschiedener Fleischarten zusammenfassend dargestellt. Der höhere Anteil an ungesättigten Fettsäuren in Schweinefleisch und Geflügelfleisch bewirkt im Vergleich zum Rindfleisch eine starke Verkürzung der Lagerungszeit. Nach 12 Monaten können in Schweinefleisch bereits oxidative Veränderungen wahrgenommen werden. Nach 15 Monaten zeigt das Fleisch deutliche Erscheinungen von Ranzigkeit (KLETTNER 1996).

Tabelle 2: Gefrierlagerungszeiten für verschiedene Fleischarten

Material	Temperatur in °C	Lagerungsfrist	Quelle
Hähnchen- und Putenfleisch	-10	4-6 Monate	RISTIC (1980)
	-15	7-13 Monate	
	-20	12-18 Monate	
	-30	15-19 Monate	
fettes Schweinefleisch (verpackt)	-18	4-5 Monate	WIRTH et al. (1990)
mageres Schweinefleisch (verpackt)	-18	6-8 Monate	
Schweinefleisch (verpackt)	-24	8-10 Monate	
	-30	12-14 Monate	
Rindfleisch (verpackt)	-18	10-12 Monate	
	-24	bis 18 Monate	
	-30	bis 24 Monate	
Kaninchenfleisch	-18	6 Monate	HERZOG (1994)

Durch unsachgemäße Gefriervorgänge bzw. schwankende Temperaturen beim Transport oder der Lagerung wird der Fettverderb noch beschleunigt. Es kommt zur Bildung großer Eiskristalle in den Geweben, die zu einer Zerstörung der Zellorganellen führen. Infolgedessen kommt es vermehrt zur Freisetzung verschiedener Enzyme, die zu einer verminderten Verzehrsqualität, Nährwertverlusten und Fettranzigkeit führen (KLETTNER 1996).

Weiterhin geht die Zunahme von ungesättigten Fettsäuren im Fleisch mit einer Abnahme der Festigkeit des Fettes und einer verminderten Oxidationsstabilität von Erzeugnissen aus diesem Fleisch einher (STIEBING und HEGERDING 2004). Zur Herstellung von Dauerwaren empfiehlt FISCHER (2001) z. B. einen Gesamtgehalt an Polyensäuren von 12 % nicht zu überschreiten.

Über die Beteiligung gewebeeigener Enzyme am Verderb von Fleisch gibt es bisher keine genauen Untersuchungen. Publikationen über Gewebslipasen existieren im Zusammenhang mit der Fleischreifung bzw. der Herstellung von luftgetrockneten Schinken oder Rohwürsten. Unterschiede in der Fettzusammensetzung und der Aktivität muskulärer Enzyme haben große Bedeutung für die Geschmacksentwicklung der einzelnen Produkte (TOLDRA et al. 1995). Eine Beeinflussung des Enzymmusters, einschließlich der Lipasen, in Schweinefleisch durch Rasse und Muskelstoffwechsel wurde von verschiedenen Autoren dokumentiert. So untersuchten HERNÁNDEZ et al. (2004) die Konzentrationen an antioxidativen, lipolytischen und proteolytischen Enzymen im Musculus psoas major von fünf verschiedenen Schweinerassen. Sie stellten fest, dass es rassespezifische Unterschiede in der Aktivität von Katalase, Superoxiddismutase, saurer Lipase und Phospholipase sowie für proteolytische Enzyme gibt. Auch CAVA et al. (2004) wiesen rassespezifische Unterschiede

lipolytischer Muskelenzyme nach. So enthielt der *Musculus longissimus dorsi* iberischer Schweinerassen neben einem höheren intramuskulären Fettgehalt auch höhere Aktivitäten an saurer und neutraler Lipase als der entsprechende Muskel der Rassen Large White oder Landrace.

CLAEYS et al. (2001) dagegen bezogen ihre Messungen der Enzymaktivitäten auf die Stressanfälligkeit zweier Schweinerassen und beobachteten ebenfalls Differenzen der Enzymaktivitäten. So wurden bei den stressanfälligen Schweinen mit 3,8 nmol Methylumbelliferonfreisetzung/min/g Muskel geringere Aktivitäten an saurer Lipase festgestellt als bei den stressresistenteren. Welche Auswirkungen diese enzymatischen Unterschiede konkret auf die Eigenschaften von Fleisch haben, wird jedoch nicht diskutiert.

Neben rassebedingten Unterschieden in der Fettzusammensetzung und den lipolytischen Aktivitäten wurde von HERNÁNDEZ et al. (1998) auch eine Beeinflussung durch den Muskelstoffwechsel beschrieben. Sie verglichen glykolytisches, oxidatives und intermediäres Muskelfleisch und stellten fest, dass oxidative Muskeln einen höheren Fettgehalt, einen größeren Anteil an ungesättigten Fettsäuren und höhere lipolytische Aktivitäten aufweisen als glykolytische Muskeln.

2.2.3 Wurstwaren

Zu den Wurstwaren zählen Roh-, Brüh- und Kochwürste.

Während Rohwürste bei ihrer Herstellung keiner Erhitzung unterliegen, werden Brühwürste und Kochwürste hitzebehandelt, wobei Temperaturen von 72 bis 75 °C im Wurstkern erreicht werden sollen (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992). Auf dieser Grundlage gibt es Unterschiede im Keimgehalt und im Verderbnispotential der verschiedenen Wurstwaren.

Der Keimgehalt von **Rohwürsten** wird durch die Reifungsvorgänge und Starterkulturen bestimmt. Durch Säuerung und Trocknung wird der stets bestehende unerwünschte Ausgangskeimgehalt (fleischspezifische Mischflora) gehemmt und erwünschte Bakterien wie Mikrokokken, Laktobazillen und Streptokokken sowie aromatisierende Hefe- und Schimmelpilzkulturen begünstigt. Besondere Bedeutung kommt den Laktobazillen zu. Sie vermehren sich in den ersten Reifetagen massiv und führen durch die Bildung von Milchsäure zu einem pH – Abfall in der Wurst. Auch in ausgereiften Rohwürsten sind sie vorherrschend und tragen, wie auch Mikrokokken und Staphylokokken, durch ihre Stoffwechselaktivitäten zur Aromatisierung des Erzeugnisses bei. Sporenbildner, wie *Bacillus spp.* und *Clostridium spp.*, kommen bei hygienisch gewonnenem Ausgangsmaterial und optimaler Herstellung der Rohwurst nur in geringer Keimzahl vor. *Pseudomonadaceae* und *Enterobacteriaceae* sowie Hefen sind zu Beginn der Reifung stark vertreten, gehen aber schon nach wenigen Stunden zahlenmäßig stark zurück (HECHELMANN 1986).

Der Verderb von Rohwürsten beruht daher im wesentlichen auf einem nicht optimalen Reifungsprozess, der durch ungünstige Beschaffenheit des Rohmaterials (Keimgehalt, DFD-Fleisch), Veränderung von Zusätzen (Trend zu kochsalzärmeren Produkten) und unzureichender Klimaführung (höhere bzw. niedrigere Temperaturen, relative Luftfeuchte und Luftbewegung in den Reifekammern) hervorgerufen wird (HECHELMANN und KASPROWIAK 1991). Verderbniserscheinungen und somit Fehlfabrikate können besonders in den ersten Stunden und Tagen auftreten, da zu diesem Zeitpunkt noch keine starke pH – Abnahme erreicht wird und das Brät besonders leicht verderblich ist. Sie können durch *Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden (HECHELMANN 1986), *Bacillus spp.* und *Micrococcus spp.* (KUNZ 1994) hervorgerufen werden und äußern sich durch Ranzigkeit, Säuerung, Fäulnis, Schmierbeläge und das Bereifen von Rohwurstzeugnissen. Bei gut ausgereiften und abgetrockneten Rohwürsten hingegen tritt ein mikrobieller Verderb nur selten auf (HECHELMANN 1986).

Bei ordnungsgemäßer Reifung ist die Haltbarkeit der Rohwürste abhängig von der Sorte, der Herstellungsweise und den Lagerungsbedingungen und umfasst bei frischen Rohwürsten ein bis zwei Wochen, bei Dauerwürsten jedoch bis zu 8 Monaten und länger (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992).

Ziel des Erhitzungsprozesses bei der Herstellung von **Brüh- und Kochwurst** ist die Abtötung aller vegetativen Keime. Werden im Inneren der Wurst keine ausreichend hohen Temperaturen erreicht, können diese Keime, neben aeroben Sporenbildnern, nachgewiesen werden. Die Folge ist ein entsprechend schneller mikrobieller Verderb dieser Produkte mit Geruchs- und Geschmacksänderungen sowie Verlust der Konsistenz. Ein anderes Problem bei der Haltbarkeit von Brühwürsten stellt die Rekontamination durch das Aufschneiden und die nachfolgende Bearbeitung der Produkte dar. BECKER et al. (2002) untersuchten 287 unverpackte, aufgeschnittene Brühwurstproben. Die mittlere Gesamtkeimzahl betrug $1,8 \times 10^6$ bis $2,2 \times 10^7$ KbE/g. Den Hauptanteil bildeten Milchsäurebakterien. *Enterobacteriaceae* spielten eine untergeordnete Rolle. Nachgewiesen wurden *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei* und *Citrobacter freundii*. Aus 3,1 % der Proben wurde *Staphylococcus aureus* isoliert. In einer älteren Publikation zur Untersuchung der Mikroflora von vorverpacktem, aufgeschnittenen Brüh- und Kochwurstproben wurden Enterobakterien, Mikrokokken, Streptokokken, *Bacillus*, Hefen und Laktobazillen als vorherrschend beschrieben (REUTER 1970).

Die Haltbarkeit von Kochwürsten beträgt bei Lagerungstemperaturen von 6°C durchschnittlich 1 – 2 Wochen. Brühwürste sind bei lichtgeschützter Lagerung und Temperaturen von 0 - 2 °C (max. 4 °C) mindestens 7 Tage haltbar (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992).

Über den Anteil eventuell vorhandener gewebeeigener oder bakterieller Enzyme am Verderb von Brühwürsten gibt es bisher keine Untersuchungen. BRAUN und FEHLHABER (2001) führten jedoch Untersuchungen zum quantitativen Vorkommen von Lipolyten und Proteolyten in Lebensmitteln tierischer Herkunft durch und stellten einen überraschend hohen Anteil dieser Verderbnisflora an der Gesamtkeimzahl fest. Dies betraf besonders erhitzte Wurst-erzeugnisse wie Brüh- und Kochwürste.

2.2.4 Fisch

Die Keimflora des Frischfisches ist stark von den Wassertemperaturen in der Fangregion geprägt. In gemäßigten kalten Salzwasserregionen mit Temperaturen von weniger als 10°C setzt sich die Keimflora zu 95 % aus psychophilen, gramnegativen, aerob wachsenden, beweglichen Stäbchenbakterien wie *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella* und *Vibrio* zusammen (LISTON 1980, ZICKRICK 1986, HUSS 1995). STENSTRÖM und MOLIN (1990) isolierten 159 gramnegative Bakterienstämme von Seefischen. Davon waren 46 % *Pseudomonas* spp. und 38 % *Shewanella putrefaciens*. In wärmeren Gewässern werden dagegen vorwiegend mesophile grampositive Keime, wie *Micrococcus*, *Bacillus* und *Corynebacterium*, und *Enterobacteriaceae* isoliert (LISTON 1980, ZICKRICK 1986).

Im Gegensatz zu den Seefischen findet sich bei Süßwasserfischen ein höherer Anteil an mesophilen grampositiven Keimen, wie *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, Coryneforme (LEUPOLD 1997). Dominant sind jedoch auch hier die Psychrophilen. Typische Gattungen sind *Aeromonas* und *Pseudomonas*.

Der Verderb von Fisch wird durch die Bakterienflora und enzymatische Vorgänge bestimmt. Nach dem Tod der Tiere kommt es durch körpereigene Enzyme zum Abbau von Eiweißen, Kohlenhydraten und Fetten. Die Autolyse begünstigt das Eindringen von Keimen aus dem Darm, der Haut und den Kiemen in den Tierkörper.

Zu den typischen Verderbnishinweisen bei Fischen gehören säuerlicher Geruch, Verlust der Elastizität der Muskulatur, Trübung und Einsinken der Augen, Verblässen der blutroten Farbe der Kiemenbögen, stumpfe Haut sowie Veränderung des Schleimmantels von wasserklar zu trüb, gelblich-grau (TÜLSNER 1994). Diese treten bereits nach wenigen Tagen auf. Bei einer unverzüglichen Kühlung nach dem Fang und Lagerung auf Eis sind Dorschartige z.B. 12 Tage und Forellen 9 - 11 Tage haltbar (SHEWAN und MURRAY 1979). In den Untersuchungen von SIPOS (2003) blieben Regenbogenforellen bis zum 3. Tag sensorisch unauffällig. Danach kam es zu einem stetigen Verlust von Frischmerkmalen. In nicht ausgenommenen Fischen wurde die Haltbarkeit besonders durch lytische Prozesse in der Bauchhöhle limitiert. Bei ausgenommenen Fischen dagegen durch äußerlich sichtbare

Verderbsvorgänge an Augen, Kiemen und Hautschleim sowie Verfärbungen der Bauchlappen und Geruchsabweichungen. Nach 9 - 13 Tagen wurden die Forellen als nicht mehr verkehrsfähig eingestuft.

TILLACK (1975) bezeichnet Fettveränderungen bei tiefgefrorenen Fischen der Familie Salmonidae (Lachs, Forellen) als Hauptursache für einen Qualitätsabfall während der Gefrierlagerung. Fischfette bestehen, im Unterschied zu Säugetierfetten, zu 80 % aus höheren ungesättigten Fettsäuren. Geschmacksveränderungen treten insbesondere durch die Bildung von Fettsäuren und den Aktomyosin – Abbau auf. Die Zersetzung des Fettes erfolgt durch Muskellipasen und bakterielle Lipasen, die zu Vertranung und Ranzigkeit führen (ZICKRICK 1986, FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992).

2.3 Nachweismethoden für den Verderb

Anerkannte Nachweismethoden für den Verderb von Lebensmitteln sind die klassische Mikrobiologie mit der Bestimmung der Gesamtkeimzahl und der Lipolytenkeimzahl sowie die sensorische Prüfung, die die Beurteilung von Aussehen, Farbe, Konsistenz, Geruch und Geschmack ermöglicht.

Speziell für die Einschätzung von Veränderungen in reinen Fetten existieren verschiedene Kennzahlen. So erlauben die so genannte Peroxidzahl und die Thiobarbitursäurezahl einen Rückschluss auf oxidative Prozesse. Hydroperoxide sind primäre Oxidationsprodukte, deren Konzentration durch die Peroxidzahl angegeben wird. Da sie jedoch geschmacksneutral sind, kann keine Beziehung zur sensorischen Qualität des Produktes hergestellt werden. Bei Peroxidzahlen von >10 in Fetten und Ölen und von $> 4,0$ in Schweineschmalz spricht man von oxidativen Verderb (Leitsätze für Speisefette und Speiseöle, ANON. 2003). Die Thiobarbitursäurezahl ist ein Maß für den Grad der Fettoxidation. Einige sekundäre Oxidationsprodukte wie Aldehyde haben die Eigenschaft, mit Thiobarbitursäure zu reagieren. Der dabei entstehende rote Farbstoff kann spektrophotometrisch bestimmt werden und wird als Thiobarbitursäurezahl in mg Malondialdehyd (MDA)/kg angegeben. Ranziger Geruch kann von einem trainierten Sensorikpanel bei Konzentrationen zwischen 0,5 und 1,0 mg MDA/kg in rohem Fleisch wahrgenommen werden (LANARI et al. 1995, CANNON et al. 1996). Bei der Beurteilung der Thiobarbitursäurezahl muss berücksichtigt werden, dass die gleiche Zahl in verschiedenen Fetten nicht den gleichen Grad an sensorisch feststellbarer Verdorbenheit bedeutet (ROSENBAUER 2002).

Eine weitere Fettkennzahl ist die Säurezahl, die den Gehalt an freien und gebundenen Fettsäuren beschreibt. Durch hydrolytische Prozesse steigt die Konzentration an freien Fettsäuren, was eine Erhöhung der Säurezahl zur Folge hat. Die Säurezahl in unveränderten

nativen Ölen sollte = 4,0 und in Schweineschmalz = 1,3 sein (Leitsätze für Speisefette und Speiseöle, ANON. 2003).

Diese Zahlen sind jedoch für Fette in komplexen Lebensmitteln nur bedingt aussagefähig.

Grundlage einer objektiveren und schnelleren Methode zur allgemeinen Kontrolle von Lebensmitteln auf Verderbniserscheinungen stellt die Erforschung des Zusammenhangs zwischen der typischen Verderbnisflora (englisch: specific spoilage organisms = SSO) ausgewählter Lebensmittel und gebildeten mikrobiellen Metaboliten dar, deren Nachweis eine Einschätzung bzw. Voraussage des mikrobiellen Verderbs ermöglichen soll. Die Untersuchungsergebnisse verschiedener Autoren (siehe Tabelle 3) deuten darauf hin, dass die Anwesenheit bestimmter Metaboliten einen Rückschluss auf spezifische Bakterien bzw. auf Verderb zulässt. Die Erfassung der Metaboliten und Identifikation erfolgt mittels Gaschromatographie oder HPLC.

Tabelle 3: Mikrobielle Metaboliten in Lebensmitteln

Verderbniserreger	untersuchte Lebensmittel	Metaboliten	Literaturquelle
<i>Clostridium estertheticum</i> <i>Clostridium laramie</i> <i>Clostridium algidicarnis</i>	vakuumverpacktes rohes Rindfleisch gesalzenes, gekochtes bzw. vakuumverpacktes Schweinefleisch	n-Butyrat	DAINTY et al. (1989) COLLINS et al. (1992) LAWSON et al. (1994)
<i>Enterobacteriaceae</i>	vakuumverpackte Kuddeln (Vormägen der Wiederkäuer) aerob gelagertes Fleisch vakuumverpacktes Fleisch	Indol Hydrogensulfid H ₂ S, Methanthiol Dimethylsulfid	GIACCONE et al. (1994) DAINTY (1996) MONTEL et al. (1998)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Schweinefleisch in O ₂ und CO ₂ angereicherter Atmosphäre	Acetoin Diacetyl 2,3 - Butandiol	DE PABLO et al. (1989) DAINTY et al. (1989) ORDONEZ et al. (1991) MONTEL et al. (1998)
<i>Pseudomonas fragi</i>	Rindfleisch	Alkylester Schwefelhaltige Verbindungen incl. Dimethylsulfid	DAINTY et al. (1989)
gram neg. Bakterien (<i>Hafnia alvei</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Alteromonas putrefaciens</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>)	keine Angabe	Hydrogensulfid	DAINTY et al. (1989)

Fortsetzung Tabelle 3

Verderbniserreger	untersuchte Lebensmittel	Metaboliten	Literaturquelle
Morganella morganii	vakuumverpackter Schinken	Indol H ₂ S	DAINTY (1996)
keine Angabe	vakuumverpacktes Rindfleisch	Ethanol	DAINTY (1996)
keine Angabe	Fisch	Trimethylamin	DAINTY (1996)

Weitere aktuelle Entwicklungen zur Detektion flüchtiger Metaboliten stellen die so genannte „elektronische Nase“ (BOOTHE und ARNOLD 2002, BENEDETTI et al. 2004) und die Nutzung der PTR-Massenspektrometrie (MAYR et al. 2003) dar. Nachteil der „elektronischen Nase“ ist, dass sie die Metaboliten nicht identifizieren kann. Dennoch wurde sie erfolgreich zur Qualitätsbeurteilung von vakuumverpacktem Rindfleisch (BLIXT und BORCH 1999), Geflügelfleisch (BOOTHE und ARNOLD 2002, NIKKOLA et al. 2002), Milch (MARSILI 2000, BREDHOLT und HAUGEN 2002) sowie „graved“ lachs (HAUGEN et al. 2002) eingesetzt.

ELLIS et al. (2005) veröffentlichten ebenfalls eine neuartige Methode, um Fleischverderb zu erkennen. Es handelt sich um die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR), mit der innerhalb von 60 s die bakterielle Belastung auf der Probenoberfläche gemessen werden kann. Bisher wird diese Technik bei Geflügelfleisch verwendet. Dabei werden nicht die Bakterien an sich erfasst, sondern biochemische Veränderungen, die durch das Wachstum und die enzymatischen Aktivitäten der Bakterien verursacht werden. Ab Keimzahlen von 10^7 KbE/cm² wurde von den Autoren ein Verderb durch Proteolyse festgestellt.

Große Bedeutung für den Lebensmittelverderb, besonders im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen und Allergien, besitzt auch der Nachweis biogener Amine (Tyramin, Histamin, Putreszin, Kadaverin) in Fisch und Fleisch (HUSS 1995, YANO 1995).

Die folgende Methode soll Erwähnung finden, da sie besonders kundenorientiert und verbraucherfreundlich ist. Es handelt sich um sogenannte TTI's (Temperatur – Zeit - Indikatoren). Sie werden in Form von selbstklebenden Etiketten eingesetzt und dokumentieren den Temperaturverlauf während des Transports und der Lagerung des entsprechenden Lebensmittels. Durch erhöhte Temperaturen werden mikrobiologische und biochemische Prozesse beschleunigt und es kommt zum schnelleren Verderb des Produktes. Diese Information wird von den TTI's verarbeitet und durch Ent- oder Verfärbung eines Etiketts angezeigt. Voraussetzung für den Einsatz sind jedoch genaue kinetische Studien sowohl der eingesetzten Indikatoren als auch der Lebensmittel, auf denen die Etiketten aufgebracht werden sollen, und die anschließende mathematische Modellierung (KREYENSCHMIDT et al. 2003). In den USA werden diese Etiketten bereits erfolgreich

eingesetzt. Erste Anwendungen zur Erkennung des Frischestatus von Geflügelfleisch in Deutschland wurden inzwischen von KREYENSCHMIDT et al. (2003) publiziert.

2.4 Lipasen (Triacylglycerolester – Hydrolasen, EC 3.1.1.3)

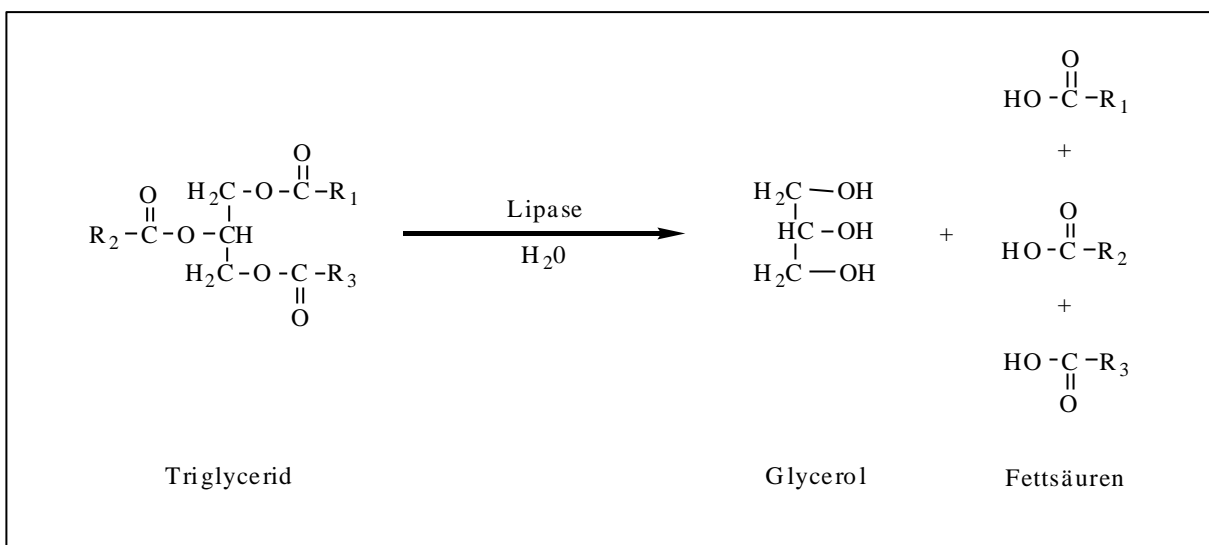
Wie bereits erwähnt spielt für die Haltbarkeit fetthaltiger Lebensmittel die Lipolyse eine erhebliche Rolle. Diese wird durch Lipasen hervorgerufen. Lipasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Triacylglyceriden und Cholesterolestern zu Mono- und Diglyceriden, freien Fettsäuren und Glycerol katalysieren (Abbildung 1). Sie können durch Bakterien synthetisiert werden, kommen aber auch als gewebseigene (originäre, endogene) Lipasen in tierischen Geweben und Organen vor.

Die verschiedenen Lipasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe und Proteinsequenz. Sie sind im Allgemeinen saure Glycoproteine mit einer relativen Molekülmasse von 7000 – 60000 D (KROLL 1994, GHOSH et al. 1996).

Eine gemeinsame Struktur stellt das dreidimensionale Faltungsmuster, der so genannte α/β -Hydrolase fold, dar (OLLIS et al. 1992). Dieser besteht aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, die durch α -Helices miteinander verbunden sind. Ein weiteres gemeinsames Strukturelement bildet die, aus den drei Aminosäureresten Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat bestehende, sogenannte katalytische Triade (CYGLER et al. 1993). Der Serin – Rest ist gewöhnlich in dem Pentapeptid Gly–Xaa-Ser-Xaa-Gly konserviert. Bei der katalytischen Triade handelt es sich um das aktive Zentrum des Enzyms. Es ist bei der inaktiven Form in wässriger Lösung durch ein oder zwei α -Helices, dem sogenannten Lid, verdeckt und wird durch Aktivierung geöffnet und dem Substrat zugänglich gemacht (TRAUB 2000). Die Aktivierung der Lipase erfolgt durch Anlagerung an die Interphase zwischen wasserunlöslichem Substrat und wässriger Lösung. Der Übergang vom inaktiven zum aktiven Enzym nennt man Grenzflächenaktivierung (SARDA und DESNUELLE 1958).

Im Unterschied zu Esterasen, die ausschließlich wasserlösliche Fettsäureester spalten können (SUGIURA 1984), hydrolysieren Lipasen hauptsächlich wasserunlösliche, langkettige Triacylglyceride (TRAUB 2000). In Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen und Reaktionsbedingungen ist die Lipolysereaktion reversibel. Eine große Rolle spielt dabei der Wassergehalt. In wasserreichen Medien überwiegt die Hydrolysereaktion, während durch Wasserentzug Synthesen begünstigt werden. Bei weitgehender Wasserfreiheit können Umesterungsreaktionen stattfinden. Durch Anwesenheit von unpolaren Lösungsmitteln werden diese Umesterungsreaktionen sowie Synthesen noch begünstigt (KROLL 1994).

Abbildung 1: Hydrolyse von Triglyceriden



Sowohl die Lipases**synthese** (bakteriell) als auch die Lipase**aktivität** werden im Wesentlichen durch den pH - Wert des Mediums, Redoxpotentiale, die Temperatur, entsprechende Substrate und verschiedene Inhibitoren und Effektoren beeinflusst. Die Lipaseproduktion ist weiterhin abhängig von verschiedenen Umweltbedingungen wie Sauerstoff-, Stickstoffgehalt, Kohlenstoffquellen, anorganischen Salzen und dem Vorkommen bestimmter Fette (GHOSH et al.1996). Sie wird stimuliert durch Fette wie Butter, Schweineschmalz, Olivenöl und verschiedene Fettsäuren (OMAR et al. 1987 a, SUZUKI et al. 1988). Viele Lipasen zeigen im Bereich des neutralen pH-Wertes von 6,0 bis 7,5 Aktivitäten. Einige können jedoch bis zu einem pH – Wert von 4,0 im sauren Milieu und bis 8,0 im alkalischen Milieu stabil sein (GHOSH et al. 1996). Das Temperaturoptimum für Lipasen mesophiler Keime befindet sich zwischen 30 und 45 °C, wobei Lipasen psychrophiler und thermophiler Keime noch Aktivitäten bei – 20 °C bzw. 65 °C zeigen können (BARISZLOVICH et al. 1990). Tabelle 4 zeigt Temperatur- und pH – Optima bakterieller Lipasen ausgewählter Verderbniserreger. Die von den einzelnen Lipasen bevorzugten Milieubedingungen werden in den folgenden Kapiteln noch genauer charakterisiert.

Tabelle 4: Temperatur- und pH – Optima verschiedener bakterieller Lipasen (nach KOPP 1997)

Mikroorganismen	Temperaturoptimum in °C	pH - Optimum	Literaturquelle
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	8,0 - 8,5	RENSHAW und SOU CLEMENTE (1967)
	32 - 55	8,0	HALPIN-DOHNALEK und MARTH (1989)
	60	6,0	MURAOKA et al. (1982)
<i>Bacillus subtilis</i>	60	5,6 - 7,2	SUGIHARA et al. (1991)
	65	8,2	KIM et al. (1994)
	35	10,0	LESUISSE et al. (1993)

Fortsetzung Tabelle 4

Mikroorganismen	Temperaturoptimum in °C	pH - Optimum	Literaturquelle
<i>Serratia marcescens</i>	45	8,0	MATSUMAE und SHIBATANI (1994)
	30 - 40	7,0	MEYER (1978)
	-	8,75	DRIESSEN und STADHOUDERS (1974 a)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	35	8,2	STEPANIAK et al. (1987)
	22	7,0	DRING und FOX (1983)
	37	6,5	LAW et al. (1976)
	35	7,8	MARANGONI (1994)
	40	8,5	ADAMS und BRAWLEY (1981 b)
	37	7,2	BLOQUEL (1989)
	35	8,0	FOX und STEPANIAK (1983)
	23	8,0	ROUSSIS et al. (1988)
	45	7,5 - 8,5	KUMURA et al. (1993)
	25	7,0	ABAD et al. (1993)
	50 - 55	8,0	SZTAJER et al.(1991)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	6,5 - 7,5	SHABTAI und DAYA-MISHNE (1992)
	55	10	PALMEROS et al. (1994)
	50	8,5 - 9,0	GILBERT et al. (1991 a)
	40	8,0 - 9,0	FINKELSTEIN et al. (1970)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30 - 40	7,0	MEYER (1978)
	35	-	KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984)

2.4.1 Gewebslipasen

Besonders im Zusammenhang mit der Fleischreifung, der Herstellung von Rohwürsten und luftgetrocknetem Schinken wird immer wieder der Einfluss gewebeeigener Enzyme, insbesondere der Lipasen und Proteasen, beschrieben (MOLLY et al. 1997, TOLDRA und FLORES 1998). Lipolytische Veränderungen in Rohmilch werden ebenfalls auf die Aktivität originärer Lipasen zurückgeführt (LAW 1979).

Wie bereits bei den Ausführungen zum Verderb (Kapitel 2.2) erwähnt, sind viele Enzyme der Gewebe auch postmortal noch aktiv. So auch die Gewebslipasen, die dann zu entsprechenden Abbauvorgängen in den fetthaltigen Geweben führen. Diese können erwünscht sein und wesentlich zur typischen Geschmacks- und Aromaausprägung von Fleisch und Wursterzeugnissen beitragen, aber auch für den Verderb dieser Lebensmittel verantwortlich sein. Bisher ist es jedoch nicht möglich, die Wirkung dieser Enzyme speziellen Verderbniserscheinungen zuzuordnen.

Gewebslipasen werden in Serum und verschiedensten Organen und Geweben wie Herz, Nieren, Milz, Lunge, Leber, Gehirn, Muskel, Fett und Arterien nachgewiesen (TAIPA et

al. 1992). Die durch tierische Zellen sekretierten Enzyme sind im allgemeinen Glycoproteine, die ein Molekulargewicht von mehr als 50000 Dalton aufweisen und durch das Vorhandensein von Disulfidbrücken gekennzeichnet sind.

Das Hauptenzym mit lipolytischer Wirksamkeit in Milch ist die Lipoproteinlipase. Sie ist hauptsächlich in den Kaseinmizellen lokalisiert (GRÜN 1985). Bei Schädigung der Fettkügelchenmembran kann sie z. B. zu spontaner oder induzierter Ranzigkeit in Rohmilch führen (FOISSY 2005).

TOLDRA und FLORES (1998) beschreiben das Vorkommen von 3 lipolytischen Enzymen im Fettgewebe (Lipoproteinlipase, hormonsensitive Lipase und Monoacylglycerollipase), die im neutralen und basischen pH - Wertbereich aktiv sind. Im Muskelgewebe wurden Aktivitäten von lysosomaler saurer Lipase, Phospholipase A2 und A1 sowie Aktivitäten einer neutralen Lipase nachgewiesen (TOLDRA und FLORES 1998).

Genaue Angaben zu Lipaseaktivitäten bzw. -konzentrationen finden sich nur vereinzelt in der Literatur. Viele Autoren weisen Lipaseaktivitäten über den Anstieg freier Fettsäuren in den Geweben nach. MOTILVA et al. (1992) und HERNÁNDEZ et al. (2004) publizierten dagegen die Lipaseaktivität in U/g Muskulatur. Sie untersuchten verschiedene Schweinefleischproben. Dabei betrug beispielsweise die Lipaseaktivität im Musculus biceps femoris im sauren pH - Bereich 0,34 U/g, im neutralen 1,03 U/g und im basischen 1,14 U/g. Die Extraktion der Lipasen erfolgte mit Tris/HCl – Puffer, pH 7,0, Zusatz von 0,2 % Triton X – 100 (MOTILVA et al. 1992). HERNÁNDEZ et al. (2004) führten Messungen im M. psoas major von verschiedenen Schweinerassen durch. Die Lipaseaktivität der sauren Lipase betrug z.B. bei Schweinen der Rasse Pietrain 0,119 U/g und bei der Iberischen Rasse 0,138 U/g. Im Vergleich dazu zeigte die neutrale Lipase 1,41 U/g bzw. 1,02 U/g.

In den folgenden Abschnitten werden die Gewebslipasen genauer charakterisiert.

2.4.1.1 Lipoproteinlipase (LPL)

Lipoproteinlipasen (EC 3.1.1.34) wurden außer in Fettgewebe und Milch auch in verschiedenen Organen und Geweben der Säugetiere sowie in Fischen nachgewiesen (BABIN und VERNIER 1989, TAIPA et al. 1992). Größere Konzentrationen an LPL kommen im Skelettmuskel-, Herzmuskel- und Fettgewebe vor (ZECHNER 1990). Dieses Enzym ist lumenseitig im Endothel der Kapillaren lokalisiert. Dort liegt es gebunden an Glucosaminoglycane, wie Heparansulfat, vor. Die Synthese der LPL erfolgt jedoch nicht im Endothel, sondern in den Parenchymzellen der Gewebe, wie z.B. in Adipozyten, Muskelfasern und Herzmuskelmyozyten (FIELDING und FRAYN 1998). LPL ist dadurch charakterisiert, daß sie durch 1M NaCl und Protamin in ihrer Aktivität gehemmt wird. Die Anwesenheit von Apolipoprotein C-II (apoC-II) und Heparin führen zu einer Stimulation der LPL – Aktivität. Der optimale pH – Wert liegt zwischen 8,0 und 8,5 (BOYER 1983, SMITH

und POWNALL 1984, BABIN und VERNIER 1989). LPL spaltet spezifisch primäre Ester. Ungesättigte Monoacylglycerole werden von ihr schneller hydrolysiert als gesättigte (TOLDRA und FLORES 1998). Die Aufgabe der LPL besteht im lebenden Organismus darin, triglyceridreiche Lipoproteine und Chylomikronen im Plasma zu hydrolysieren und somit deren Plasmagehalt zu regulieren (CRYER et al. 1978, BOYER 1983). Aus diesem Grund wird die LPL auch als „clearing factor“ bezeichnet.

2.4.1.2 Hormonsensitive Lipase (HSL, neutrale Lipase)

Die hormonsensitive Lipase, auch neutrale Lipase genannt, kommt hauptsächlich im weißen Fettgewebe vor, scheint aber auch im Muskelgewebe, Hoden, braunen Fettgewebe, in der Milchdrüse und im Pankreas exkretiert zu werden. Sie zeigt maximale Aktivitäten bei einem pH – Wert von 7,0 und hydrolysiert die Esterbindungen der Triacylglycerole, Diacylglycerole, Cholesterolester sowie Steroid- und Retinolester. Die Bedeutung der HSL beruht darauf, dass durch sie aus intrazellulären Triacylglycerolen Fettsäuren freigesetzt werden, die vom Organismus als Energiequelle für andere Gewebe genutzt werden (MERSMANN 1998, OSTERLUND 2001). Wie der Name schon sagt, wird die Aktivität dieser Lipase durch Hormone reguliert, wobei die katabolen Hormone wie Kortikotropin, Adrenalin, Noradrenalin und Glukagon einen stimulierenden und anabole Hormone wie Insulin einen hemmenden Effekt haben (OSTERLUND 2001).

2.4.1.3 Monoacylglycerol – Lipase

Die Lipolyse im weißen Fettgewebe wird durch die Monoacylglycerol – Lipase (MGL) unterstützt. Während die HSL Triacyl- und Diacylglycerole spaltet, hydrolysiert die Monoacylglycerol – Lipase 1- oder 2-Monoacylglycerole (OSTERLUND 2001).

2.4.1.4 Lysosomale Lipase (saure Lipase)

Für den intrazellulären Abbau von Cholesterolestern und Triacylglycerolestern spielt die lysosomale Lipase eine zentrale Rolle. Eine aus der Leber eines Menschen isolierte lysosomale Lipase wies eine Größe von ca. 38 kDa auf. Das gereinigte Enzym zeigte maximale Aktivitäten bei einem pH – Wert von 4,5 bis 5,0 (AMEIS et al. 1994).

In der Muskulatur von Schweinen wurden ebenfalls lysosomale Lipaseaktivitäten gemessen, deren pH – Optimum bei 5,5 lag. Im Fettgewebe von Schweinen konnten dagegen keine Aktivitäten nachgewiesen werden (MOTILVA et al. 1992). GEROMEL und MONTGOMERY (1980) berichten über eine lysosomale Lipase in der dunklen Lateralmuskulatur von Regenbogenforellen. Diese wies optimale Aktivitäten bei pH– Werten von 4,2 bis 4,5 und 7,8 auf.

2.4.1.5 Hepatische Triglyceridlipase (HTGL)

Ein weiteres, der LPL ähnliches, Gewebsenzym ist die hepatische Triglyceridlipase, deren pH- Optimum zwischen 8 und 9 liegt. Im Gegensatz zur LPL wird diese Lipase nicht durch 1 M NaCl und Protamin gehemmt und ist nicht von Apolipoprotein C-II abhängig (BOYER 1983). Das Enzym wird in den Leberzellen gebildet und an die Lebersinusoidalzellen gebunden, wo sich die Aktivität entfaltet. HTGL hydrolysiert Mono-, Di- und Triglyceride sowie Phospholipide (STAHNKE 1987).

Auch in der Leber von Forellen und Kabeljau sowie in roter und weißer Muskulatur, Herz, Gehirn, Fettgewebe und Ovarien von Forellen wurde eine der HTGL in Säugetieren entsprechende salzunempfindliche Lipase gefunden (BABIN und VERNIER 1989).

2.4.2 Mikrobielle Lipasen

Nach einigen allgemeinen Ausführungen zu mikrobiellen Lipasen werden im folgenden Kapitel Mikroorganismen vorgestellt, die aufgrund ihrer hydrolytischen Eigenschaften große Bedeutung für den Fettverderb besitzen. Dazu gehören Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Serratia* und *Proteus*. Wie aus dem Kapitel 2.2 hervorgeht, sind diese Bakterien wesentlicher Bestandteil der Verderbnisflora tierischer Lebensmittel.

Ein Großteil der bakteriellen Lipasen sind extrazelluläre Lipasen und werden durch die externe Zellmembran in das Kulturmedium abgegeben. Die Lipasesynthese beginnt in der Regel während der logarithmischen Wachstumsphase und erreicht in der stationären Phase ihr Maximum (SINGH 1973, STEAD 1987). BORRISS (1988) erwähnt zusätzlich zwei weitere Möglichkeiten zum Verlauf der Lipasesynthese. So können Bakterienwachstum und Enzymsynthese auch gleichzeitig einsetzen oder parallel verlaufen, aber die Bildung der extrazellulären Lipasen setzt sich nach Wachstumsabschluß fort.

In den einzelnen Abschnitten werden sowohl die für den Lebensmittelverderb relevantesten lipasesezernierenden Keime als auch deren synthetisierte Lipasen charakterisiert.

2.4.2.1 Gattung *Pseudomonas*

Die Vertreter der Familie *Pseudomonadaceae* sind gramnegative, aerobe Stäbchen und aufgrund ihrer polaren Begeißelung beweglich. Sie sind in der Lage sich in einem Temperaturbereich von 0 bis 42 °C zu vermehren. Charakteristisch für Pseudomonaden sind die Bildung der Farbstoffe Pyocyanin, Pyoverdin und Pyorubin und das Vorhandensein lipolytischer und proteolytischer Aktivitäten. Einige *Pseudomonas aeruginosa* – Stämme produzieren ein hitzelabiles Enterotoxin, das enteropathogene Erscheinungen hervorrufen kann.

In der Natur sind Pseudomonaden weit verbreitet. Sie kommen im Boden, Wasser und Abwasser vor und werden hauptsächlich aus Fleisch, Milch, Fisch, Ei und anderen eiweißreichen, gekühlten Lebensmitteln isoliert.

Zwei lebensmittelhygienisch besonders bedeutende Arten sind *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens*. Während *Pseudomonas aeruginosa* bis zu einer Temperatur von 41 °C wachsen kann, ist die Vermehrung von *Pseudomonas fluorescens* bei den geprüften Temperaturen von 37 °C und 41 °C nicht möglich. Jedoch kann das Wachstum von *Pseudomonas fluorescens* auch bei Temperaturen unter 7 °C erfolgen, weshalb er als psychrotroph gilt. Immer wieder wird über die Dominanz von lipolytisch aktiven *Pseudomonas fluorescens* – Stämmen in gekühlten Kuhmilchprodukten aber auch in Ziegenmilch, Käse und frischem Fleisch berichtet (LAW et al. 1976, RODERIGUEZ-FERNANDEZ et al. 1992, NEUMEYER et al. 1997, DIECKELMANN et al. 1998, LEBERT et al. 1998), was zu geschmacklichen Beeinträchtigungen und Lagerungsproblemen führt.

Ein großes Problem stellt zudem die enorme Thermostabilität einiger *Pseudomonas* – Lipasen dar, die verschiedene Erhitzungsprozesse z.B. in der Milchindustrie überstehen können und zum Verderb von Milchprodukten führen (MC KELLAR und CHOLETTE 1986). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Einfluss unterschiedlicher Hitzebehandlungen auf die Aktivität verschiedener *Pseudomonas* – Lipasen.

Tabelle 5: Thermostabilität von *Pseudomonas* – Lipasen (nach KOPP 1997)

Mikroorganismen	Temperatureinwirkung		Aktivitätsverlust in %	Literatur
	Temperatur in °C	Zeit		
<i>Pseudomonas</i> <i>spp.</i>	60	24 h	4	IIZUMI (1990)
	71,5	10 min	88	BUCKY et al. (1986)
	80	10 min	11-18	BUCKY et al. (1987 b)
	130	15 sec	< 77	GARCIA et al. (1989)
	137,8	20,7 sec	59	ADAMS und BRAWLEY (1981 b)
	140	5 sec	12-15	BUCKY et al. (1987 b)
	148,9	3,4 sec	73	ADAMS und BRAWLEY (1981 b)
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	60	30 min	80	BLOQUEL (1989)
	63	30 min	36	LAW et al. (1976)
	63	30 min	26,7	KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984)
	70	30 min	40	SZTAJER et al. (1991)
	71	15 sec	75,3	MOTTAR (1981)
	72	16 sec	9,33	KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984)
	80	10 min	88	BLOQUEL (1989)

Fortsetzung Tabelle 5

Mikroorganismen	Temperatureinwirkung		Aktivitätsverlust in %	Literatur
	Temperatur in °C	Zeit		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	30 sec	< 60	FITZGERALD und DEETH (1983)
	120	1 min	70	DRING und FOX (1983)
	140	3,6 min	90	ANDERSSON et al. (1979)

Besonders günstige Bedingungen für die Aktivität von *Pseudomonas* – Lipasen stellen Temperaturen von 30 bis 37 °C, pH – Werte von 7 bis 8 und a_w – Werte von 0,98 bzw. 0,95 dar. Hohe Aktivitäten der *Pseudomonas fluorescens* – Lipasen wurden allerdings auch bei Temperaturen von 20 °C beobachtet (BLOQUEL 1989, SHABTAI und DAYA-MISHNE 1992, ABAD et al. 1993, KOPP 1997). KOPP (1997) ermittelte im Kühlbereich bei 7°C und 2°C ebenfalls noch erhebliche Aktivitäten.

Pseudomonas – Lipasen können nach ARPIGNY und JÄGER (1999) in 3 Subfamilien eingeteilt werden. Die erste Subfamilie ist durch eine Molekulargröße von 30-32 kDa gekennzeichnet. Neben den Lipasen von *Pseudomonas aeruginosa* zählen auch die Lipasen von *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas wisconsinensis* und *Proteus vulgaris*, aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit, zu dieser Familie.

Durch eine Größe von 33 kDa sind die Lipasen der Subfamilie II gekennzeichnet, zu der die Lipasen von *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas cepacia* und *Chromobacterium viscosum* gehören.

Die Expression der aktiven Form der Lipase in den Subfamilien I und II ist von einem Helferprotein, der so genannten „lipase-spezifisch-foldase“, abhängig. Charakteristisch für die beiden Subfamilien sind außerdem eine Signalsequenz und eine Disulfidbrücke.

Lipasen von *Pseudomonas fluorescens* und *Serratia marcescens* werden der Subfamilie III zugerechnet. Sie weisen eine Molekulargröße von 50 bzw. 65 kDa auf. Gemeinsame Merkmale dieser Gruppe sind das Fehlen eines N – terminalen Signalpeptids und eines Cys-Rests (TRAUB 2000, ARPIGNY und JAEGER 1999).

2.4.2.2 Gattung *Bacillus*

Keime der Gattung *Bacillus* sind grampositive, aerob und fakultativ anaerob wachsende, peritrich begeißelte Stäbchen, die Endosporen bilden können (BAUMGART 1999). Wichtige Verderbniserreger dieser Gattung sind *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis*. Das Wachstumsoptimum für *Bacillus subtilis* liegt bei 35 °C (KUNATH 1981). Bazillen sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet. Infolge von Sekundärkontaminationen (z.B. Schlachtprozess bzw. Herstellungsprozesse) und durch ihre resistenten Endosporen werden

sie oft aus Lebensmitteln wie Wursterzeugnissen, Milch und Milchprodukten, Fleisch und Gewürzen isoliert (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992, BAUMGART 1999).

Beim Rohwurstverderb werden z.B. *Bacillus* spp. als Verursacher fauliger Schnellreifung mit dumpfem, muffigem Geruch und des „Fadenziehens“ beschrieben (KLUG 1997). Brühwurstveränderungen in Form von Erweichung an den Sattelstellen werden in besonderem Maße durch *Bacillus subtilis* – Stämme hervorgerufen (SCHREITER 1986).

Besonders *Bacillus subtilis* – Stämme werden als lipolytisch aktiv beschrieben. KOPP (1997) untersuchte sechs verschiedene Stämme, von denen fünf lipolytische Aktivitäten zeigten. Maximale Lipasewirkungen wurden bei 30 °C, pH – Wert 7,3 und a_w – Wert 0,98 festgestellt. Selbst bei Kühltemperaturen von 7 °C konnten noch schwache Aktivitäten verzeichnet werden. Erst eine Temperatur von 2 °C und ein a_w – Wert von 0,80 führten zu nicht mehr nachweisbaren Lipaseaktivitäten (KOPP 1997).

Die lipolytischen Aktivitäten von *Bacillus cereus* sind wesentlich geringer. In den Untersuchungen von KOPP (1997) erwies sich von fünf *Bacillus cereus* – Stämmen nur einer als lipolytisch aktiv. Keime dieser Spezies haben jedoch aufgrund ihrer Enterotoxinsynthese große Bedeutung im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen. Es werden 2 Enterotoxine unterschieden, die Vomitus bzw. Diarrhoe hervorrufen.

Bacillus – Lipasen gehören wie auch die *Pseudomonas* – Lipasen zu den „echten“ Lipasen. Bei ihnen ist das erste Glycin im konservierten Pentapeptid (siehe Kapitel 2.4) durch Alanin ersetzt. *Bacillus subtilis* und *Bacillus pumilus* sezernieren Lipasen mit einer Größe von ca. 20 kDa. Die Größe der von *Bacillus stearothermophilus* und *Bacillus thermocatenulatus* gebildeten Lipasen beträgt ca. 45 kDa. Sie zeigen maximale Aktivitäten bei einem pH – Wert von 9 und einer Temperatur von 65 °C (ARPIGNY und JAEGER 1999). SUGIHARA et al. (1991) beschreiben eine *Bacillus* – Lipase, die ca. 22 kDa groß ist und deren optimaler pH – Wert bei 30 °C zwischen 5,5 und 7,2 liegt. Die Optimaltemperatur bei pH 5,6 beträgt 60 °C. Die Lipase zeigt nur eine geringe Substratspezifität gegenüber einfachen Triglyceriden und hydrolysiert alle 3 Esterbindungen, wobei sekundäre Esterbindungen bevorzugt werden.

Eine Einteilung der *Bacillus* – Lipasen in 3 Subfamilien wurde von EGGERT et al. (2000) vorgenommen. Zur Subfamilie 1 werden die Lipasen der thermophilen Stämme *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus* und *Bacillus thermoleovorans* gezählt. Ihre Aminosäuresequenzen sind zu mehr als 95 % identisch und zeigen Sequenzhomologien zu den *Staphylococcus* – Lipasen. Eine Esterase von *Bacillus licheniformis*, die nur geringe Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz mit anderen *Bacillus* – Lipasen aufwies, wurde der Subfamilie 2 zugerechnet, während die Lipasen der mesophilen Stämme *Bacillus subtilis* und *Bacillus pumilus* die Subfamilie 3 bilden. Ihre Sequenzen gleichen sich zu 80 % und haben kaum Ähnlichkeiten zu anderen gram - positiven Bakterien.

Die gleichen Autoren (EGGERT et al. 2000) beschrieben bei *Bacillus subtilis* eine Lipase, die bei einem pH – Wert von 6,0 bis 8,0 maximale Aktivität gegen Phosphatidylglycerol zeigte. Sie wurde daher als Phospholipase klassifiziert.

2.4.2.3 Gattung *Staphylococcus*

Staphylokokken sind unbewegliche, gram – positive, kugelförmige Bakterien, die sich traubenförmig zusammenlegen. Das Temperaturoptimum liegt bei 37 °C. Ein Wachstum kann jedoch von 10 bis 45 °C erfolgen (PETERS und PULVERER 1988). Lebensmittelhygienisch bedeutsame Vertreter dieser Gattung sind *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus hyicus*. Sie gehören bei Mensch und Tier zur Normalkeimflora, sind aber auch in der Lage zu ausgedehnten Infektionen zu führen. Eine besondere Bedeutung im Lebensmittelbereich kommt, auf Grund seiner Fähigkeit zur Enterotoxinbildung, dem Keim *Staphylococcus aureus* zu. Zusätzlich bildet er eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme, wie Koagulase, Nuklease, Hämolysin und Lipase, die auch für den Lebensmittelverderb von Bedeutung sind.

Staphylococcus spp. können auf Rohwürsten so genannte Schmierbeläge verursachen. Auf luftgetrockneter Wurst ist durch apathogene Staphylokokken und Hefen die Bildung eines gelblichen, stippchenförmigen Belages möglich, der auch als „Wurstblüte“ bezeichnet wird (HECHELMANN 1986). Neben diesen unerwünschten Staphylokokken sind in der Rohwurstherstellung die Stoffwechselaktivitäten einiger bestimmter Staphylokokken erwünscht, wie z.B. die von *Staphylococcus xylosus* und *Staphylococcus carnosus*, die auch als Starterkulturen eingesetzt werden.

Staphylococcus aureus - Lipasen bevorzugen neutrale Lipide mit vier Kohlenstoffatomen sowie p-Nitrophenylester und verwerten keine Phospholipide. *Staphylococcus hyicus* - Lipasen weisen eine 5-10 fach höhere Lipaseaktivität auf als die von *Staphylococcus aureus* und zeigen gegenüber der Kettenlänge der Fettsäuren keine Spezifität (KAMPEN et al. 1998). Genauso wie die *Staphylococcus aureus* - Lipase verwertet die *Staphylococcus epidermidis* - Lipase besonders gut das Substrat Tributrylglycerol und greift keine Phospholipide an (SIMONS et al. 1998).

Maximale Enzymaktivitäten zeigen *Staphylococcus aureus* – Lipasen bei Temperaturen von 30 und 37 °C, einem pH – Wert von 7,3 und a_w – Werten von 0,98 und 0,95 (KOPP 1997). Auch bei niedrigeren Temperaturen von 7°C und 2 °C können auf Tributyrin – Agar noch geringe Lipaseaktivitäten verzeichnet werden (KOPP 1997).

Das pH-Optimum der Lipase von *Staphylococcus epidermidis* liegt nach SIMONS et al. (1998) bei 6,0, wobei bei einem pH von 7,0 noch 90 % Restaktivität vorhanden ist.

Temperaturen von 65 °C für 30 min führen zu einer Inaktivierung von *Staphylococcus epidermidis* - Lipasen. *Staphylococcus aureus* – Lipasen dagegen werden erst durch 71 bzw. 75 °C inaktiviert (KOPP 1997). Den Aktivitätsverlust durch andere Erhitzungstemperaturen gibt Tabelle 6 wieder.

Tabelle 6: Einfluss unterschiedlicher Hitzebehandlungen auf die Aktivität von *Staphylococcus* - Lipasen (nach KOPP 1997)

Mikroorganismus	Temperatureinwirkung		Aktivitätsverlust in %	Literatur
	Temperatur in °C	Zeit		
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	30 min	5	MURAOKA et al. (1982)
	55	30 min	40	MURAOKA et al. (1982)
	60	30 min	99	MURAOKA et al. (1982)
	63	30 min	49,41	SINGH et al. (1973)

Staphylococcus – Lipasen werden als Vorstufen sekretiert. Diese sind ca. 70 kDa groß und werden im extrazellulären Medium durch eine spezifische Protease gespalten. Propeptide ermöglichen den Durchtritt der Lipase durch die Zellmembran (GÖTZ et al 1998). Die maturierten, gereinigten Lipasen von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus hyicus* weisen eine Molekulargröße von 34 und 46 kDa auf. Sie werden durch zweiwertige Ionen wie z.B. Ca^{2+} stimuliert und durch EDTA gehemmt. Sie sind Lipoproteine mit einem pH-Optimum zwischen 7,5 und 9,0 (BRUNE und GÖTZ 1992). Während *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* nur lipolytische Aktivitäten zeigen, wird für *Staphylococcus hyicus* neben der Lipaseaktivität auch eine Phospholipaseaktivität beschrieben (GÖTZ et al. 1998, SIMONS et al 1998). *Staphylococcus*-Lipasen wurden bisher, aufgrund ihrer Fähigkeit emulgierte Öle und Fette zu hydrolysieren und ihrer Resistenz gegenüber Esteraseinhibitoren wie Diethyl-p-nitrophenolphosphate, Atoxyl oder Tetraethylpyrophosphate, in die Klasse der Glycerolester – Hydrolasen (Lipasen) eingeteilt (SHAH und WILSON 1965). Da sie jedoch auch wasserlösliche Triglyceride und Tween hydrolysieren können, wird momentan diskutiert, ob sie als Esterasen klassifiziert werden sollten (GÖTZ et al. 1998).

2.4.2.4 Gattung *Aeromonas*

Aeromonaden sind gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien, die der Familie der *Vibrionaceae* angehören. Lebensmittelhygienisch bedeutsame Vertreter dieser Gattung sind *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas caviae*. Sie sind in der Lage, sich bei Kühlschranktemperaturen bis 5 °C zu vermehren (PALUMBO et al. 1991) und können daher zu den psychrotrophen Bakterien gezählt werden. Die Optimaltemperatur für die Gattung *Aeromonas* wird in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) mit 22 bis 28 °C angegeben. Wasser stellt das Hauptreservoir für diese Keime dar, jedoch werden sie auch

im Darminhalt von Mensch und Tier sowie in Lebensmitteln tierischer Herkunft nachgewiesen (FEHLHABER UND JANETSCHKE 1992). Sie können sich auf verschiedenen Lebensmitteln vermehren und wurden in Milchprodukten, Wurst und Fleisch sowie Fisch und Meeresfrüchten nachgewiesen (PALUMBO et al. 1991, KIROV 1993, SANTOS et al. 1996). *Aeromonaden* sind in der Lage, Exotoxine zu bilden, die Gastroenteritiden beim Menschen hervorrufen.

Über die Bedeutung von *Aeromonaden* als Lipolyten wird zwar immer wieder berichtet (GRIFFITHS et al. 1981, KALOGRIDOU-VASSILIADOU 1984, KOPP 1997), jedoch existieren genaue Daten über Substratspezifitäten, Temperatur- bzw. pH - Optima ihrer Lipasen nur in begrenztem Umfang. KOPP (1997) beobachtete, dass *Aeromonas* – Lipasen das synthetische Substrat Tween 60 wesentlich besser hydrolysieren als das Substrat Tributyrin. Optimale Aktivitäten zeigten diese Lipasen bei einer Temperatur von 37 °C, einem pH – Wert von 7,3 und a_w – Werten von 0,95 bis 0,98. Kühlttemperaturen von 7 °C und 2 °C führen zwar zu einer Reduzierung der Aktivitäten, können diese aber nicht vollständig unterbinden (KOPP 1997). *Aeromonas* – Lipasen können eine erhebliche Thermostabilität aufweisen, wie die Angaben in Tabelle 7 zeigen, und somit in erhitzten Lebensmitteln aktiv bleiben.

Tabelle 7: Einfluss unterschiedlicher Hitzebehandlungen auf die Aktivität der *Aeromonas* - Lipasen (nach KOPP 1997)

Mikroorganismus	Temperatureinwirkung		Aktivitätsverlust in %	Literatur
	Temperatur in °C	Zeit		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	63	30 min	29,7	KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984)
	63	30 min	18,9	KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984)
	63	30 min	53	LAW et al. (1976)
	72	16 sec	16,2	KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984)
	72	16 sec	5,2	KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984)

Die Lipasen von *Aeromonas hydrophila* gehören nach den molekularbiologischen Untersuchungen von ARPIGNY und JAEGER (1999) in die Familie der GDSL – Lipasen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie nicht das konventionelle Gly–Xaa-Ser-Xaa-Gly Pentapeptid bilden, wie einige der *Pseudomonas*-, *Staphylococcus*- und *Bacillus* – Lipasen, sondern der aktive Serin - Rest im Motiv Gly-Asp-Ser-(Leu) enthalten ist.

2.4.2.5 Gattung *Serratia*

Serratien gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Es handelt sich um fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchen. Sie sind peritrich begeißelt und nicht in der Lage, Sporen zu bilden. *Serratia marcescens* bildet ein hellrotes Pigment, das Prodigiosin. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 25 bis 30 °C. Keime dieser Gattung sind in der Natur weit verbreitet und wurden unter anderem aus Gemüse und Lebensmitteln tierischer Herkunft, Milch sowie Obst- und Gemüsesäften isoliert (HOLMES und GROSS 1990, SINGH et al. 1997, ABDOU 2003).

Informationen über lipolytische Aktivitäten von *Serratia marcescens* sind begrenzt. ABDOU (2003) betont die Bedeutung von Serratien für den Verderb von Milch und Milchprodukten und charakterisiert die Lipase eines psychrotrophen *Serratia marcescens* – Stammes. Diese wies eine Molekularmasse von 52 kDa auf. Der optimale pH – Wert für diese Lipase lag zwischen 8 und 9 und die optimale Temperatur war 37 °C. Jedoch wurden auch bei 5 °C noch 90 % der maximalen Aktivität beobachtet. Eine vollständige thermische Inaktivierung gelang erst bei Temperaturen von 90 °C über 5 min. Eine von SINGH et al. (1973) untersuchte *Serratia* – Lipase zeigte nach 30-minütiger Erhitzung bei 60 °C nur einen Aktivitätsverlust von 64 %.

SEVERINA und BASHKATOVA (1981) fanden heraus, dass Lipasen von *Serratia marcescens* Butterfett sowie Oliven – und Kokosnussöl hydrolysieren und bei einem pH – Wert von 8,0 bis 8,5 aktiv sind. SINGH et al. (1976) isolierten aus Büffelmilch-Cheddar-Käse einen *Serratia marcescens* – Stamm, der Butteröl bei Temperaturen von – 18 °C hydrolysierte. KOPP (1997) untersuchte Lipaseaktivitäten von *Serratia* – Stämmen auf Tributyrin- und Tween 60 – Agar. Sie zeigten maximale Lipaseaktivitäten bei 30 und 37 °C und einem pH – Wert von 7,3 und auch im niedrigen Temperaturbereich von 7°C und 2°C konnten noch schwache Aktivitäten ermittelt werden.

ARPIGNY und JAEGER (1999) ordnen die *Serratia* –Lipasen in die Subfamilie III der *Pseudomonas* – Lipasen ein.

2.4.2.6 Gattung *Proteus*

Die Gattung *Proteus* gehört ebenfalls zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Zwei bekannte Vertreter dieser Gattung sind *Proteus mirabilis* und *Proteus vulgaris*. Es handelt sich um gramnegative, bewegliche Stäbchen, die bei Temperaturen von 5 bis 45 °C wachsen. Sie sind fakultativ anaerob. *Proteus* – Keime sind ubiquitär verbreitet und werden aus vielen Lebensmitteln isoliert. Sie gehören zu den unspezifischen Lebensmittelvergiftern und spielen als Proteolyten und Lipolyten eine Rolle beim Verderb von Fleisch (KUNZ 1994).

KOPP (1997) stellte maximale Enzymaktivitäten von *Proteus mirabilis* - Lipasen bei einer Temperatur von 37 °C, einem pH – Wert von 7,3 und einem a_w – Wert von 0,95 fest. Tiefere Temperaturen führten zu einer Abnahme der Lipaseaktivität, aber erst Temperaturen von 2 °C unterbanden jegliche Aktivität.

Während Tween 60 von einem Großteil der Stämme gespalten wurde, schien Tributyrin kein geeignetes Substrat zu sein.

2.5 Industrielle Anwendung von Lipasen

Die Bedeutung mikrobieller Lipasen ist vielfältig und erstreckt sich über einen großen Anwendungsbereich.

In der Lebensmittelindustrie kommen Lipasen in der Milchwirtschaft und zur Modifikation von Fetten und Ölen zur Anwendung. Sie werden zur Beschleunigung der Reifung von Käse, zur Geschmacksverstärkung und Veränderung des Käsearomas eingesetzt. So werden Lipasen von *Candida mycoderma* und *Debaryomyces hansenii* für die Herstellung von Limburger – Käse verwendet und die lipolytischen Eigenschaften von *Penicillium roquefortii* führen zum ausgeprägten Geschmack von Roquefort – Käse (REZANKA 1991). In den USA werden mit einem „enzymmodifizierten Käsearoma“ (ECM) Cracker, Dips, Salatsaucen etc. hergestellt. Hierbei werden pregastrische Lipasen von Schaf und Ziege sowie aus *Mucor miehei* und *Aspergillus* genutzt. Nicht zu vergessen ist auch die Nutzung lipolytischer Starterkulturen für die Herstellung fermentierter Wurstwaren.

Eine andere Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie stellt die Herstellung strukturierter Triglyceride dar. Durch Umesterung von Triglyceriden kann das Streichverhalten bzw. die Schmelztemperatur eines Fettes verändert werden. Zum Beispiel werden Kakaobutter – Äquivalente durch Umesterung des preiswerten Palmöls mit Stearinsäure produziert. Außerdem ermöglichen Lipasen die Synthese „funktioneller“ Triglyceride für Säuglingsnahrung oder spezielle Diäten (TRAUB 2000).

Aber Lipasen spielen aufgrund ihrer Eigenschaften nicht nur für die Lebensmittelindustrie eine große Rolle. Auch die Waschmittel- und Pharmakonzerne nutzen die Eigenschaften von Lipasen. In Waschmitteln dienen sie zur Lösung von Fettverschmutzungen aus der Textilfaser und verhindern außerdem die erneute Anlagerung bereits gelöster Fette an die Faser. Zu diesem Zweck werden mikrobielle Lipasen verwendet, die den hohen Waschttemperaturen und pH – Werten standhalten (TRAUB 2000). In der Pharmaindustrie sind sie an der Bildung optisch aktiver Substanzen beteiligt, die Zwischenstufen für die Herstellung hochwirksamer Medikamente wie z.B. nichtsteroidaler Antiphlogistika, Antibiotika oder Pestizide darstellen (PANDEY 1999).

Relativ neu ist die Nutzung von Lipasen zur Bewältigung von Umweltproblemen, z.B. beim Abbau von Fetten in Haushaltsabwässern (STEAD 1986) oder die direkte Kultivierung lipolytischer Keime in Abfällen (PANDEY 1999).

Neben diesen, für den Menschen positiven, Einsatzmöglichkeiten und Eigenschaften der Lipasen, muss berücksichtigt werden, dass sie z.B. auch an der Pathogenese verschiedener Krankheiten beteiligt sind und das Eindringen von Krankheitserregern in den Organismus ermöglichen bzw. unterstützen.

Außerdem sind sie, wie mehrfach erwähnt, Ursache für immense Verluste durch Verderbnisprozesse in Lebensmitteln. Die nähere Charakterisierung dieser Prozesse stellt einen Schwerpunkt dieser Dissertation dar und soll die Einführung von entsprechenden Interventionsmaßnahmen ermöglichen.

2.6 Methoden zur Bestimmung von Lipaseaktivitäten

Das Vermögen von Enzymen, Umsetzungen von spezifischen Substraten zu katalysieren, stellt die Basis der Enzymaktivitätsbestimmung dar (RENNEBERG und RUTTLOFF 1994). Da Enzyme der Gewebe und biologischen Flüssigkeiten nur in sehr geringen Mengen vorkommen, ist eine direkte Bestimmung durch physikalisch – chemische Methoden nicht möglich. Um die Aktivität von Enzymen einschätzen zu können, wird daher entweder der Substratverbrauch oder die Bildung der Reaktionsprodukte physikalisch – chemisch bestimmt. Die Bestimmung der Enzymaktivität oder auch „katalytischen Aktivität“ erfolgt durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeit, mit der ein von diesem Enzym katalysierter Substratumsatz erfolgt. Besteht ein Überschuss an Reaktionspartnern, so ist die Geschwindigkeit des Substratumsatzes proportional der Menge des im Test vorhandenen Enzyms (LÖFFLER und WEISS 1998).

Die **Enzymaktivität** wird in „katal“ (kat) oder in „IUPAC – IUB – Units“ (U) angegeben. 1 katal bezeichnet den Umsatz von 1 mol Substrat je 1 s, während 1 U die Umwandlung von 1 μ mol Substrat je 1 min beschreibt. Die Einheiten werden auf die Menge des umgesetzten Substrates bzw. auf das Volumen der Testmischung bezogen (RENNEBERG und RUTTLOFF 1994). International üblich ist auch die Angabe der spezifischen Aktivität, die in kat/mg bzw. U/mg Protein angegeben wird (BARISZLOVICH et al. 1990).

Zur **Bestimmung von Lipaseaktivitäten** existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten. Einige, häufig beschriebene, Methoden werden in Tabelle 8 zusammengefasst.

Prinzipiell werden physikalisch-chemische und immunologische Methoden unterschieden. Der Aktivitätsnachweis mit physikalisch-chemischen Methoden kann durch Abnahme der Substratkonzentration oder über die Freisetzung von hydrolytischen Reaktionsprodukten wie Protonen, freien Fettsäuren, Alkohol oder Thiol erfolgen. Diese werden über Trübungs-

messungen, Titrimetrie, Spektrophotometrie, Gaschromatographie, HPLC oder Spannungsänderungen wie bei der Monolayerfilmtchnik erfasst. Mit der Monolayerfilmtchnik können die Kinetik und die Konzentration von Lipasen bestimmt werden. In ein Reaktionsgefäß aus Teflon, gefüllt mit einer wässrigen Lösung, wird eine Platinelektrode getaucht, mit der Spannungsveränderungen an der Grenzfläche zwischen Wasser und Luft durch enzymatische Reaktionen ermittelt werden können. Zunächst wird ein wasserunlöslicher monomolekularer Lipidfilm auf der Oberfläche der wässrigen Lösung verteilt und anschließend die Lipaselösung unter die Lipidschicht injiziert. Die Oberflächenspannung nimmt durch die Löslichkeit der hydrolytisch gebildeten Reaktionsprodukte ab. Voraussetzung für die Anwendung der Methode sind ein wasserunlöslicher monomolekularer Substratfilm und wasserlösliche Reaktionsprodukte. Aus diesem Grund werden vorwiegend synthetische Fettsäureester verwendet. BEISSON et al. (2000) berichten von einer alternativen Methode, bei der die nicht oberflächenaktive Substanz β -Cyclodextrin in der wässrigen Phase unter dem Lipidfilm gelöst wurde, um die gebildeten langkettigen lipolytischen Reaktionsprodukte aus dem Lipidfilm neutraler Acylglycerole und Phospholipide zu binden. Die Monolayer – Technik ist hochsensitiv und erfasst genauso hohe Konzentrationen an Lipase wie die titrimetrische pH – Stat – Methode (BEISSON et al. 2000). Jedoch wurde bisher nicht geklärt, ob das Verhalten an Luft – Wasser – Grenzflächen mit dem an Öl – Wasser – Grenzflächen oder komplexen Biomembranen vergleichbar ist.

Mit immunologischen Methoden, die als Radioimmunoassay oder als ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) Anwendung finden, können aktive und inaktive Lipaseformen erfaßt werden. Sie ermöglichen weiterhin sowohl die Ermittlung der Lipaseaktivität als auch der absoluten Lipasemenge.

Die Bestimmung der Aktivität verschiedener Lipasen ist stark vom verwendeten Substrat und von den Reaktionsbedingungen abhängig. Häufig eingesetzte Substrate sind Triolein und Olivenöl, die speziell von Lipasen hydrolysiert werden können. Tributyrin, Tween (Polyethylenglycol-Sorbitan-Fettsäureester) und Substrate, die chromophore Gruppen als Alkoholanteil besitzen (z. B. 4-Methylumbelliferon-, Eosin-, Fluorescin-, Naphthol- und p-Nitrophenol - Fettsäureester), stellen keine lipasetypischen Substrate dar, da sie partiell wasserlöslich sind und auch von Esterasen gespalten werden können. Faktoren, die die Lipolysebedingungen und damit den Test beeinflussen, sind das Temperaturoptimum, das für viele Lipasen zwischen 30 und 45 °C liegt, sowie das pH – Optimum der zu bestimmenden Lipase. Durch Puffer wird der optimale pH – Wert, der für die meisten Lipasen zwischen pH 7 und pH 9 liegt, konstant gehalten. Eingesetzt werden dazu Phosphatpuffer, $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$ - und Trispuffer.

Tabelle 8: Methoden zur Bestimmung von Lipaseaktivitäten

Methoden	Enzyme	Charakteristik der Methode	Substrate	Lipasenachweis	Literaturquelle
Agarplattentest bzw. Ringagardiffusions-test	bakterielle Lipasen und Esterasen	Nachweis der Reaktion zwischen Lipasen und eingesetzten Substraten direkt um Bakterienkolonie oder um ausgestanzte Agarlöcher mit zellfreiem Kulturüberstand	Tributyrin	Aufhellung des Agars	FOX und STEPANIAK (1983) MC KELLAR und CHOLETTE (1986) KOPP (1997) VENUGOPAL et al. (1994)
			Tween	Trübung des Agars	KOPP (1997)
			Tween + Nilblau	Hellgrüne Zone auf dunkelblauem Hintergrund	KARNETOVA et al. (1984)
			Olivenöl + Rhodamin B Triolein + Rhodamin B	Orange Fluoreszenz unter UV-Licht (350nm)	KOUKER und JÄGER (1987) HINRICHSSEN et al. (1994)
			Butterfett + Viktoriablau	Blaufärbung des Agars	KOPP (1997)
			Tween + Viktoriablau, Methylrot und Rhodamin B	dem Indikator entsprechende Färbung des Agars	SAMAD et al. (1989)
Titrimetrie/ pH-Stat-Methode	bakterielle, pflanzliche und gewebseigene Lipasen (Serum, Plasma, Verdauungsenzyme)	Bestimmung freigesetzter Fettsäuren	Emulsionen natürlicher und synthetischer Fettsäuren (Triacetin, Tripropionin, Tributyrin, Tricaproin, Tricaprylin, Tricaprin, Triolein)	Bestimmung der Menge an NaOH, die zutitriert werden muss, um die bei Lipolyse freigesetzten Fettsäuren zu neutralisieren	BLOQUEL (1989) KORDEL et al. (1991) GILBERT et al. (1991 b) EGGERT et al. (2000) BEISSON et al. (2000)
Spektrophotometrische Methoden	bakterielle Lipasen, Phospholipasen	Nachweis der Reaktion zwischen Lipasen und eingesetzten Substraten	Eigelb-Phosphatidylcholine Dipalmitoylphosphatidylglycerol Phosphatidylinositol Triolein	Safranin = kationischer Farbstoff mit metachromatischen Eigenschaften, durch lipolytische Reaktion Absorptionsänderung (bei 520 nm und 560 nm)	RAWYLER und SIEGENTHALER (1989)

Fortsetzung Tabelle 8

Methoden	Enzyme	Charakteristik der Methode	Substrate	Lipasenachweis	Literaturquelle
Spektrophotometrische Methoden	bakterielle Lipasen, z.B. <i>Staphylococcus</i> – Lipase	Nachweis der Reaktion zwischen Lipasen und eingesetzten Substraten	Tributyrin	Spektrophotometrische Erfassung (450 nm) der Aufklärung der Tributyrin-Emulsion durch Lipasen	SMELTZER et al. (1992)
	bakterielle (z.B. <i>Ps. fluorescens</i>), pflanzliche (z.B. Gewürze) und gewebseigene (z.B. Schweinefleisch) Lipasen	Bestimmung von aus Fettsäureestern freigesetzten chromogenen Alkoholkomponenten	para-Nitrophenolfettsäureester	Messung der Absorption bei 405 nm	BEISSON et al. (2000) KORDEL et al. (1991)
			β-Naphthylfettsäureester, z.B. β-Naphthylcaprylat	Messung der Absorption bei 540 nm	MC KELLAR und CHOLETTE (1986)
			Fluoreszeinfettsäureester	Bestimmung der Fluoreszenz	BARISZLOVICH et al. (1990)
			Eosinfettsäureester		BARISZLOVICH et al. (1990)
			4-Methylumbelliferonfettsäureester		STEAD (1984) HASLBECK et al. (1985) HERNÁNDEZ et al. (1998) MOTILVA et al. (1992) DIECKELMANN et al. (1998) CLAEYS et al. (2001)
			Br, Cl-Indoxylcaprylat	reflektometrische (570 nm) Messung über Farbreaktion	MÜNNICH und HAASMANN (1999) BRAND et al. (2000)
Immunologische Methode / ELISA	bakterielle und gewebseigene Lipasen, z.B. LPL, hepatische Lipase, <i>S. aureus</i> -Lipase	direkte Bestimmung der Lipase	Bindung eines polyklonalen Ak an Mikrotiterplatte → Zugabe der Lipase (Ag) → Zugabe eines monoklonalen Ak, der fluoresziert → Lipasekonzentration wird über Menge an gebundenem monoklonalem Ak bestimmt		BEISSON et al. (2000)

3 Material und Methoden

Lipolytische Aktivitäten sind, wie aus den vorherigen Kapiteln ersichtlich, von großer Bedeutung für die Qualität und Haltbarkeit von Lebensmitteln. Bisher fehlte ein Test, der es unter Praxisbedingungen ermöglicht, in kurzer Zeit Lipasekonzentrationen gewebeeigener oder bakterieller Herkunft sowohl in Lebensmitteln als auch in anderen Medien quantitativ zu bestimmen. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Test zu etablieren, der sich für die Messung von Lipasekonzentrationen in Lebensmitteln tierischer Herkunft und in Bakterienbouillons eignet. Die ermittelten Messwerte sollen Aufschluss über synthetisierte Lipasekonzentrationen wichtiger Verderbniserreger und über die zu erwartenden Lipasekonzentrationen in unbehandelten Lebensmitteln geben.

Über die Firma Merck KGaA ist kommerziell ein Schnelltest zur Bestimmung nativer und mikrobieller Lipasekonzentrationen in Milch sowie in Getreide, Getreideprodukten und biologischen Proben erhältlich. Der Reflectoquant® Lipase – Test ermöglicht es, quantitative Lipasewerte innerhalb von 15 min zu ermitteln.

In **Voruntersuchungen** sollte zunächst festgestellt werden, ob sich der Reflectoquant® Lipase – Test für die Messung von Lipasen in Nährbouillons und weiteren Lebensmitteln tierischen Ursprungs eignet. Daraus ergaben sich als Aufgabenstellung die Entwicklung von Applikationsvorschriften für die:

- Bestimmung bakterieller Lipasekonzentrationen in einem flüssigen Nährmedium sowie
- Ermittlung von Lipasekonzentrationen in Fleisch, Wursterzeugnissen, Fisch, Fischerzeugnissen und Leber.

Das Ziel der **Hauptuntersuchungen** war es, mit den entwickelten Applikationsvorschriften folgende Sachverhalte zu klären:

- Ermittlung des Spektrums an bakteriellen Lipasen, die mit dem Reflectoquant® Lipase – Test erfasst werden können,
- Erfassung der Konzentration synthetisierter Lipasen ausgewählter Verderbniserreger,
- Bestimmung gewebeeigener Lipasen in frischem Fleisch, Wursterzeugnissen, Fisch, Fischerzeugnissen und Leber,
- Restaktivitäten der Lipasen nach 5-minütiger Erhitzung bei 50, 60, 70 und 80 °C und Möglichkeiten einer Differenzierung zwischen bakteriellen und gewebeeigenen Lipasen aufgrund einer möglichen Thermostabilität,
- Vergleich der Substratverwertbarkeit verschiedener bakterieller Lipasen gegenüber Caprylat, Tributyrin und Tween 60.

3.1 Voruntersuchungen

3.1.1 Reflectoquant® – Lipase – Test (Merck KGaA, Darmstadt)



Für die Bestimmung der Lipasekonzentration wurde der Reflectoquant® Lipase - Test (Merck; 1.05851) verwendet, der eine quantitative Angabe im Bereich 10 - 400 µg/l bzw. kg liefert. 10 µg/l entsprechen dabei einer Enzymaktivität von 4 U/l (bezogen auf Lipoproteinlipase aus *Pseudomonas* 400 U/mg entsprechend Analysezertifikat für Art. 1.05389.0001). Der Test basiert auf der lipasespezifischen Spaltung des Substrates Br, Cl, -Indoxylcaprylat, die durch eine blaue bzw. lila Farbbildung angezeigt wird und reflektrometrisch quantifizierbar ist. Laut Herstellerangaben werden für den Messansatz 0,25 ml der Probelösung (z.B. Milch) und 1,0 ml des Probenpuffers Lip 2 gemischt (Verdünnung 1:5). Das mit Br, Cl - Indoxylcaprylat getränkte Analysestäbchen wird mit beiden Reaktionsflächen in den Messansatz eingetaucht. Anschließend wird die überschüssige Flüssigkeit abgeschüttelt und das Analysestäbchen in eine mit dem Verstärkerreagenz Lip1 gefüllte Halbmikroküvette gestellt und bei 25 °C 15 min inkubiert. Bei abweichenden Temperaturen muss der Messwert mit einem entsprechenden Faktor korrigiert werden, der vom Hersteller angegeben ist. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Teststäbchen sofort entnommen, die überschüssige Flüssigkeit abgeschüttelt und in das Reflektometer RQflex® (Merck, 1.16970) eingeführt.

Innerhalb von 5 sec erscheint im Display das Messergebnis in $\mu\text{g/l}$. Liegt der Lipasegehalt der Probe unterhalb von $10 \mu\text{g/l}$, zeigt das Gerät „LO“ an, liegt er oberhalb von $400 \mu\text{g/l}$ so erscheint im Display „HI“. Im Test - Set enthalten sind zwei Barcode – Streifen: „Lipase – Milk“ und „Lipase“. Vor Messung der Lipase muss das Reflektometer mit dem entsprechenden Streifen kalibriert werden.

Die folgenden Substanzen können laut Angaben der Firma Merck den Reflectoquant® Lipase – Test falschpositiv bzw. –negativ beeinflussen: Ascorbinsäure, H_2O_2 , Benzoesäure, Saccharose, Formaldehyd, NaCl , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, NO_2^- , Harnstoff, Sorbinsäure, SO_3^{2-} , Tween.

3.1.2 Eignungsprüfung des Reflectoquant® – Lipase – Tests zur Messung bakterieller Lipasekonzentrationen in Nährbouillon

Voraussetzung für die Anwendung des Reflectoquant® Lipase – Tests zur Untersuchung mikrobieller Lipaseaktivitäten war die Herstellung einer Bouillon, die das Wachstum der Bakterien bzw. die Synthese von Lipasen ermöglicht, aber auch die Messung der Lipasekonzentrationen mit dem Test nicht störend beeinflusst. Eine Stimulation der Lipasesekretion sollte durch den Zusatz von Olivenöl, Tributyrin und Thiamin zur Nährbouillon induziert werden.

Folgende Zusammensetzung der Bouillon erwies sich als geeignet und wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

Rezeptur der Bouillon (Lipolytenbouillon):

12,0 g/l Caseinpepton
 5,0 g/l Natriumchlorid
 1,0 g/l Hefe
 50 $\mu\text{l/l}$ Olivenöl
 50 $\mu\text{l/l}$ Tributyrin
 0,001 g Thiamin

Die auf den pH - Wert 7,1 eingestellte Bouillon wurde 15 min bei 121°C autoklaviert.

Mit einem **Wiederfindungsversuch**, dessen Durchführung in der Arbeitsanweisung 1 schematisch dargestellt ist, erfolgte die Eignungsprüfung der Bouillon zur Messung der Lipasekonzentration. Es wurden zwei Messansätze (Ansatz A bzw. B) hergestellt. Während Ansatz A die zu prüfende lipasefreie sterile Lipolytenbouillon enthielt, beinhaltete der Ansatz B den Probenpuffer Lip 2. Ansatz B stellte die Kontrolle für die tatsächlich zugesetzte Lipasekonzentration dar. Beiden Ansätzen wurden definierte Konzentrationen einer Lipoproteinlipase zugesetzt und anschließend die Wiederfindung errechnet.

Arbeitsanweisung 1: Versuchsdurchführung zur Wiederfindung der Standardlipase in Bouillon

Herstellung der Messansätze	
Ansatz A (Bouillon)	Ansatz B (Probenpuffer)
Zugabe gleicher Lipasekonzentrationen einer Lipoprotein – Lipase aus <i>Pseudomonas</i> * zur Bouillon bzw. zum Probenpuffer Lip 2	
Herstellung des Messansatzes: 0,25 ml Probe (Ansatz A bzw. B) + 1,0 ml Lip 2	
Analyse mit dem Reflectoquant® Lipase – Test	
Verwendung des Barcodestreifens "Lipase" Reagens Lip 1 in Halbmikroküvette füllen (0,8 ml – 1 ml) und auf 25 °C temperieren Lipasestäbchen mit beiden Reaktionszonen kurz in den entsprechenden Messansatz eintauchen Flüssigkeit gut vom Stäbchen abschütteln innerhalb von 10 Sekunden das Analysestäbchen in die Küvette mit Lip 1 stellen 15 min bei 25 °C inkubieren Reflectometer RQflex nach Ablauf der 15 min Reaktionszeit einschalten und START-Taste 1x drücken Stäbchen in den Stäbchenadapter einführen und sofort nochmals START-Taste drücken nach Ablauf der Reaktionszeit von 5 sec Messwert in µg/l Lipase ablesen	
Berechnung der Wiederfindung	
Wiederfindung in % = (Messwert Ansatz B – Messwert Ansatz A) *100	

* 400 U/mg, entsprechend Analysezertifikat für Art. 1.05389.0001

Mit dem errechneten Wert sollte überprüft werden, wieviel Prozent der zugesetzten Lipase tatsächlich in der Bouillon gemessen werden können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Wiederfindung der Standardlipase in Lipolytenbouillon

Lipasekonzentration in µg/l	Wiederfindung in %
400	104,5
100	90
50	118

Es ist zu berücksichtigen, dass der Hersteller für die Konzentrationen 400 µg/l und 100 µg/l eine Schwankungsbreite von 10 % und für 50 µg/l eine von 20 % angibt. Aufgrund dieser Schwankungen kann die Wiederfindung größer als 100 % sein.

Da sich die Wiederfindung innerhalb der Schwankungsbreite bewegte, erwies sich die Bouillon als geeignet.

3.1.3 Entwicklung von Applikationsvorschriften für den Einsatz des Reflectoquant® Lipase – Tests zur Untersuchung von Lipasekonzentrationen in ausgewählten Lebensmitteln tierischer Herkunft

Bei Lebensmitteln tierischer Herkunft handelt es sich zumeist um feste Proben, für die keine entsprechenden Applikationsvorschriften zur Verfügung standen. Die Anwendung des Reflectoquant® Lipase – Tests setzt ein flüssiges Medium voraus. Daher wurde in den ersten Experimenten nach Möglichkeiten gesucht, Extrakte aus ausgewählten Lebensmitteln (Fleisch, Fisch, Fleisch- und Fischerzeugnisse und Leber) zu gewinnen. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Lebensmittel wie Farbe, Konsistenz und Inhaltsstoffe, traten verschiedene Probleme bei der Extraktgewinnung sowie der Lipasemessung auf. Die Durchführung der Experimente und Lösungsvorschläge für die auftretenden Probleme werden in den folgenden Kapiteln der Voruntersuchungen für jedes Lebensmittel einzeln besprochen.

Für die Messung von Lipasen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test ist der Probenpuffer Lip 2 notwendig. Da die in der Testpackung enthaltene Puffermenge für diese Untersuchungen nicht ausreichend war, wurden die benötigten Mengen nach untenstehender Rezeptur selbst hergestellt.

Rezeptur des Probenpuffers Lip 2 (Herstellerangaben)

- 500 mmol/l Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
- 4 mmol/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat
- 2 mmol/l EDTA
- pH-Wert mit 0,1 M Salzsäure auf 8,0 einstellen
- 0,1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin)

Für die Pufferherstellung wurde steriles, lipasefreies Aqua dest. verwendet.

3.1.3.1 Fleisch (Schweine-, Rind-, Hähnchen- und Kaninchenfleisch)

Für die Extraktgewinnung aus den verschiedenen Fleischarten wurden folgende Überlegungen umgesetzt. Das Messgerät RQ flex® (Merck) setzt eine Verdünnung der Proben von 1:5 voraus. Daher wurden 3 g der Fleischproben in diesem Verhältnis mit Probenpuffer verdünnt. Eine ausreichende Zerkleinerung der Fleischstücke wurde durch verschiedene Küchengeräte wie Moulinette, Mixstäbe etc. oder durch Dispergierer wie dem Ultra – Turrax – Gerät erreicht. Der Vorteil des Ultra – Turrax bestand darin, dass das Dispergierwerkzeug zwischen den einzelnen Proben schneller gereinigt werden konnte und eine Sterilisation möglich war. Im Anschluss an die Homogenisierung der Proben mit dem Ultra – Turrax (IKA Labortechnik) bei 13500 U/min erfolgte für 10 min die Zentrifugation bei 14000 rpm und 25 °C. Durch die hohe Wasserbindung entstand allerdings lediglich eine z. T.

rot gefärbte gelartige Masse, die von einer Fettschicht überlagert war. Für die Anwendung des Reflectoquant Lipase - Tests war dieser Ansatz ungeeignet.

Ausgehend von diesem Versuch manifestierten sich folgende Probleme:

1. hohe Wasserbindung der Proben
2. Fettgehalt der Proben (Herstellerinformation)
3. rote Eigenfarbe des Fleischextraktes
4. vermutlich geringe Lipasekonzentrationen in den Proben.

Problemlösung (Darstellung aller Lösungsansätze in Tabelle 10):

Für einen optimalen Testablauf ist ein pH – Wert von 8,0 notwendig, der jedoch in rohen Fleischproben eine starke Wasserbindung durch die Fleischeiweiße bewirkt.

Infolge der Ultra – Turrax – Behandlung bildet sich daher diese bereits erwähnte gelartige Masse. Eine Vorzerkleinerung der Proben mit der Schere in möglichst kleine Stücke und eine Verkürzung der Homogenisierungszeit konnte diesen Effekt vermindern.

Durch zusätzliche Variationen der Turrax – Zeit bzw. Turrax - Drehzahl, der Lösungsmittel (Puffer Lip 2, Aqua dest. sowie Aqua dest. – Puffer – Gemisch) und Verdünnung der Probe konnte ein flüssiger Extrakt hergestellt werden. Eine stärkere Verdünnung der Proben konnte aufgrund der niedrigen Lipasekonzentrationen nicht vorgenommen werden.

Wie aus der Tabelle 10 hervorgeht, erwiesen sich die Methoden 3, 4 und 8 als prinzipiell geeignet, ausreichend große Extraktmengen für die Testdurchführung zu gewinnen. Die Extraktgewinnung mit Aqua dest. bzw. Aqua dest. – Probenpuffer - Gemisch (Methode 3 und 4) verlief zwar erfolgreich, die Lipasemengen waren jedoch im Vergleich zur Methode 8 niedriger. Bei letztgenannter Methode wurde der Probenpuffer Lip 2 fraktioniert zugegeben, d.h. die Probenhomogenisierung erfolgte nur mit der Hälfte des Gesamtpuffervolumens. Die nach der Homogenisierung entstandene gelartige Probenmasse wurde anschließend mit der restlichen Puffermenge wieder verflüssigt. Durch Zentrifugation konnten danach die Phasen voneinander getrennt werden, so dass ein flüssiger Extrakt entstand. Methode 8 erwies sich somit als die optimale Variante. Die Aufarbeitung nach den anderen Methoden verursachte entweder homogene, gelartige Massen oder nur geringe Extraktmengen, die zur Lipasemessung ungeeignet waren.

Der Messvorgang zur Bestimmung der Lipase erfolgte direkt in den Extrakten nach folgendem Schema:

- Verwendung des Barcodestreifens "Lipase"
- Reagens Lip 1 in Halbmikroküvette füllen (0,8 ml – 1 ml) und auf 25 °C temperieren
- ca. 0,5 ml Extrakt mit der Pipette auf beide Reaktionszonen des Lipasestäbchens tropfen und anschließend sofort abschütteln
- Analyse wie unter Kapitel 3.1.2/ Arbeitsanweisung 1

Tabelle 10: Aufarbeitungsmethoden für die Extraktgewinnung aus Fleisch

Probenmenge: 3g

Zentrifugation: 10 min, 14000 rpm, 0 °C

Methode	Gerät	Zeit	Lösungsmittel	Verdünnung der Probe	Beschreibung des Extraktes nach Zentrifugation	Lipase in µg/l	Beurteilung
1	Ultra-Turrax 13500 U/min	1 min	Lip 2	1:5	homogen, rote Eigenfarbe, gelartig	-	ungeeignet
2		1 min	Lip 2	1:10	homogen, rote Eigenfarbe, gelartig	-	ungeeignet
3		1 min	Lip 2 - Aqua dest. – Gemisch (1:1)	1:5	hohe Extraktmenge, flüssig, trüb, rote Eigenfarbe	15	relativ niedrige Lipasewerte
4		1 min	Aqua dest	1:5	hohe Extraktmenge, flüssig, trüb, rote Eigenfarbe	30	relativ niedrige Lipasewerte
5		15 sec	Lip 2	1:5	geringe Probenzerkleinerung, rote Eigenfarbe	-	ungeeignet
6		30 sec (Intervall im Abstand von 1sec)	Lip 2	1:5	geringe Extraktmenge, flüssig, trüb, rote Eigenfarbe	-	ungeeignet
7	Ultra-Turrax 8000 U/min	30 sec (Intervall im Abstand von 1sec)	Lip 2	1:5	geringe Extraktmenge, flüssig, trüb, rote Eigenfarbe	-	ungeeignet
8		30 sec (Intervall im Abstand von 1sec)	Lip 2	1:5 fraktionierte Zugabe!	ausreichende Extraktmenge, flüssig, trüb, rote Eigenfarbe	48	geeignet
9	Ultraschall Cycle 6, Amplitude 30	2 x 20 sec auf Eis	Lip 2	1:5	homogen, rote Eigenfarbe, gelartig	-	ungeeignet

Um die laut Herstellerangaben durch Fett hervorgerufenen Störungen zu minimieren, konnte mit der Zentrifugationstemperatur von 0 °C ein Erstarren der Fette in den Proben erreicht werden. Durch Zentrifugation bei dieser Temperatur setzte sich das erstarrte Fett auf der flüssigen Phase ab und konnte mittels eines Spatels entfernt werden.

Ein weiteres Problem, das bei der Lipasemessung in den Fleischextrakten auftrat, stellte die rote Eigenfarbe, hervorgerufen durch Myoglobin, dar. Es traten gehäuft unerwartet hohe Lipasewerte auf, die nur durch die unterschiedlich starke rote Eigenfarbe erklärbar waren.

Um den Einfluss der Eigenfarbe auszuschließen, wurden zwei Möglichkeiten erarbeitet:

- Zunächst wurde das Teststäbchen vor Eintauchen in das Verstärkerreagenz Lip 1 mit dem Reflektometer gemessen und dann nach Ablauf der 15-minütigen Reaktionszeit nochmals. Durch Differenzbildung aus beiden Messwerten sollte der Lipasewert errechnet werden. Dabei kam es jedoch zu größeren Schwankungen und somit wiederum zu ungenauen Messergebnissen.
- Eine weitere Möglichkeit stellte die Verwendung eines so genannten Leerstäbchens dar, das auf der Reaktionsfläche kein Substrat enthält. Es wurde von der Firma Merck zur Erfassung von Störsubstanzen entwickelt. Das Leerstäbchen wird wie ein Teststäbchen behandelt und parallel zum Lipase – Teststäbchen mitgemessen. Der endgültige Lipasewert einer Fleischprobe ergibt sich aus der Differenz der Messwerte des Lipasestäbchens und des Leerstäbchens. Die mit dieser Methode erzielten Messergebnisse waren zufrieden stellend replikabel.

In Anlehnung an die Untersuchungsergebnisse empfiehlt es sich, für die Lipasemessung von rot gefärbten Extrakten ein Leerstäbchen mitzuführen.

Adäquat zur Eignungsprüfung der Bouillon wurden auch mit den Fleischextrakten **Wiederfindungsversuche** durchgeführt. Aufgrund des gewebseigenen Lipasegehaltes der Probenextrakte musste, im Gegensatz zur Bouillon, ein zusätzlicher Ansatz gemessen werden. Ansatz A entspricht der gewebseigenen Lipasekonzentration im Probenextrakt, Ansatz B beinhaltet den gewebseigenen Lipasegehalt zusammen mit der definiert zugesetzten Lipasekonzentration und Ansatz C diente als Kontrollansatz der tatsächlich zugesetzten Lipasekonzentration in Probenpuffer Lip 2. Die Arbeitsanweisung 2 gibt einen Überblick über die Versuchsdurchführung.

Arbeitsanweisung 2: Versuchsdurchführung zur Wiederfindung der Standardlipase in Fleischextrakten

Herstellung von 3 Messansätzen		
Ansatz A	Ansatz B	Ansatz C
Extraktherstellung nach Methode 8		-
-	Zugabe definierter Lipasekonzentrationen einer Lipoprotein - Lipase aus <i>Pseudomonas</i> * zum Extrakt bzw. zum Probenpuffer Lip 2	
Analyse mit dem Reflectoquant® Lipase – Test direkt in den Ansätzen		
Ablauf siehe Arbeitsanweisung 1		
Berechnung der Wiederfindung		
Wiederfindung in % = (Messwert Ansatz B – Messwert Ansatz A) *100 / Messwert Ansatz C		

* 400 U/mg, entsprechend Analysezertifikat für Art. 1.05389.0001

Die Ergebnisse des Wiederfindungsversuches für die verschiedenen Fleischsorten sind in Tabelle 11 zusammenfassend dargestellt. Sie weisen auf eine gute Wiederfindung hin. Mit der entwickelten Extraktionstechnik und Messmethodik ist der Reflectoquant® Lipase – Test zur Messung von Lipasen in rohem Schweine-, Rind- Geflügel- und Kaninchenfleisch geeignet. Für die Lipasebestimmung in anderen Fleischsorten empfiehlt sich eine Eignungsprüfung in Anlehnung an die in der Arbeitsanweisung 2 dargestellte Versuchsdurchführung.

Tabelle 11: Ergebnisse der Wiederfindung der Standardlipase in Fleischextrakten

Probe	zugesetzte Lipasekonzentration in µg/l	Wiederfindung in %
Schweinefleisch	100	98
Rindfleisch	100	100,8
Geflügelfleisch	100	95
Kaninchen	100	93

3.1.3.2 Fisch (Kabeljau, Forelle, Hering)

Die Erfahrungen bei der Aufarbeitung von Fleischproben konnten für die Extraktgewinnung aus Fisch erfolgreich genutzt werden. Die Extrakte wurden, wie schon bei Fleisch beschrieben, durch Verdünnung mit Probenpuffer im Verhältnis 1:5, Homogenisierung mit dem Ultra - Turrax (8000 U/min, 30 sec im Intervall von 1 sec) und 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm, 0 °C gewonnen.

Die Mitführung eines Leerstäbchens war nicht erforderlich, da es sich bei den Extrakten um farblose Flüssigkeiten handelte.

Im Gegensatz zu den untersuchten Fleischextrakten zeigten die aus Fisch höhere Lipasewerte, so dass für einige Fischarten eine höhere Verdünnung des Extraktes notwendig wurde. Dies betraf besonders fettreichere Fische wie Forelle oder Hering. Hier erwies sich

eine weitere Extraktverdünnung von 1:10 mit Probenpuffer als günstig. Das Messergebnis muss in diesem Falle mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Für die Untersuchung der Lipasekonzentration in fettärmeren Fischen, wie Kabeljau, ist keine weitere Verdünnung des Extraktes erforderlich.

Die Wiederfindungsversuche mit den Extrakten erfolgten analog denen für Fleisch (siehe Arbeitsanweisung 2). Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnisse der Wiederfindung der Standardlipase in Fischextrakten

Probe	zugesetzte Lipasekonzentration in $\mu\text{g/l}$	Wiederfindung in %
Forelle	100	107
Kabeljau	100	92

Somit war eine akzeptable Wiederfindung gegeben, so dass mit dem Reflectoquant® Lipase – Test Lipasekonzentrationen in Fischextrakten nach oben entwickelter Methodik, bestimmt werden können.

3.1.3.3 Leber

Die Extraktgewinnung aus Leber erfolgte analog der Methode für Fisch und Fleisch. Das Gewebe enthält, als Stoffwechselorgan, im Vergleich zu den anderen untersuchten Lebensmitteln tierischer Herkunft, erhebliche Mengen an Lipase, so dass das Extrakt stark verdünnt werden musste. Über eine Verdünnungsreihe mit Probenpuffer konnte der optimale Verdünnungsfaktor von 1:500 bestimmt werden. Durch die starke Verdünnung stellte die Eigenfarbe der Probe kein Problem dar. Die Lipasemessung erfolgte direkt im verdünnten Extrakt. Der endgültige Lipasewert der Probe ergab sich durch Multiplikation des Messwertes mit dem Verdünnungsfaktor.

Wie auch bei Fleisch und Fisch wurden mit den Leberextrakten Wiederfindungsversuche nach der schon beschriebenen Methode durchgeführt. In Tabelle 13 ist das Ergebnis dargestellt.

Tabelle 13: Ergebnis der Wiederfindung der Standardlipase im Leberextrakt

Probe	zugesetzte Lipasekonzentration in $\mu\text{g/l}$	Wiederfindung in %
Schweineleber	250	103

Aufgrund der hohen Verdünnung mit Probenpuffer sind keine Störeinflüsse, z.B. durch Eigenfarbe oder einer der vom Hersteller genannten Substanzen (siehe Kapitel 3.1.1) zu erwarten. Dies bestätigen die sehr guten Ergebnisse der Wiederfindung im verdünnten

Leberextrakt. Der Reflectoquant® Lipase – Test eignet sich zur Bestimmung von Lipasekonzentrationen.

3.1.3.4 Wursterzeugnisse (Brühwurst, Kochwurst, Rohwurst)

Für die Untersuchung wurden Brüh-, Koch- und Rohwürste ausgewählt. Bei den ersten Versuchen zur Extraktgewinnung aus den Proben bzw. Lipasemessung ergaben sich wiederum einige Probleme, die gelöst werden mussten:

- hohe Wasserbindung (bei Rohwürsten)
- Entfernung von Fett aus dem Extrakt
- Eliminierung der Ascorbinsäure aus Wurstextrakten (Störsubstanz laut Herstellerangaben)

Problemlösung:

Für die Extraktgewinnung aus Brüh- und Kochwurst wurden zunächst die mit der Schere vorzerkleinerten Proben 1:5 mit Probenpuffer verdünnt und mit dem Ultra - Turrax (8000 U/min) im Intervall (30 sec im Abstand von 1 sec) homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 0 °C konnte ein Überstand gewonnen werden. Für die Fettextraktion aus den zentrifugierten Proben bewährte sich, wie auch bei Fleisch, die Zentrifugationstemperatur von 0 °C. Das erstarrte Fett setzte sich über dem Extrakt ab und wurde mittels eines Spatels abgehoben. Das Extrakt konnte danach vorsichtig abpipettiert werden.

Die Aufbereitung von Rohwürsten bereitete dagegen die gleichen Probleme wie bei Fleisch. Die Wasserbindung war sehr hoch und es entstand die schon bekannte gelartige Masse. Eine Übernahme der Methodik zur Extraktgewinnung aus Fleisch (siehe Tabelle 10/ Methode 8) erwies sich als günstig. Die nach der Zentrifugation auch hier entstandene Fettschicht über dem Extrakt wurde ebenfalls mit einem Spatel entfernt.

Die Problematik der Eigenfarbe der Extrakte spielte bei den Brüh- und Kochwürsten keine Rolle. Die Extrakte waren gelblich bis farblos. Bei Rohwürsten trat eine leichte Rosafärbung des Extraktes auf. Wie schon bei der Entwicklung der Applikationsvorschrift für Fleisch beschrieben (siehe Kapitel 3.1.3.1) erwies sich das Leerstäbchen als geeignet, diese Färbung zu erfassen.

Wursterzeugnissen kann, laut Herstellerinformation, Ascorbinsäure zugesetzt werden. Der Gebrauchsanweisung des Reflectoquant® Lipase – Tests ist zu entnehmen, dass die Messergebnisse durch Ascorbinsäure beeinflusst werden. Es wird jedoch nicht erwähnt, ab welcher Konzentration mit einer Störung zu rechnen ist.

Um den Reflectoquant® Lipase - Test trotzdem auf Wursterzeugnisse anwenden zu können,

mussten folgende Sachverhalte geklärt werden:

- Wie hoch sind die Ascorbinsäurekonzentrationen in den Extrakten?
- Welchen Einfluss haben sie auf das Messergebnis?
- Gibt es Möglichkeiten der Elimination der Ascorbinsäure aus den Extrakten?

Zur Bestimmung der Ascorbinsäurekonzentration in den Extrakten standen der Reflectoquant® Ascorbinsäure – Test (Merck 1.16981.0001), der L-Ascorbinsäure – Test für Biochemische Analytik und Lebensmittelanalytik (Boehringer Mannheim 409677) und die Bestimmung mittels HPLC nach der Methode von SCHÜEP und KECK (1990) zur Verfügung. Alle 3 Methoden erwiesen sich jedoch als ungeeignet, die Ascorbinsäurekonzentration im Extrakt zu bestimmen. Die Zusammensetzung des Probenpuffers und dessen hoher pH – Wert führten vermutlich zu Störungen der einzelnen Tests.

Um dennoch eine Einschätzung des Ascorbinsäuregehaltes der Proben zu ermöglichen, wurde eine indirekte Methode entwickelt. Ausgehend von der Überlegung, dass das von der Fa. Merck entwickelte Leerstäbchen (siehe Kapitel 3.1.3.1 Fleisch/Eigenfarbe) Störungen des Reflectoquant® - Lipase – Tests durch Violettfärbung anzeigt, wurde geprüft bei welchen Ascorbinsäurekonzentrationen keine Störung des Tests mehr zu erwarten sind. Dies wird durch die fehlende Färbung des Leerstäbchens angezeigt. Mittels einer Standardreihe von Ascorbinsäure in Probenpuffer ohne Lipase wurden Messungen sowohl mit dem Lipaseteststäbchen als auch mit dem Leerstäbchen durchgeführt. Beide Teststäbchen wurden mit dem Reflektometer RQflex® gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Einfluss der Ascorbinsäure auf das Lipaseteststäbchen und Leerstäbchen in Probenpuffer ohne Lipase

Ascorbinsäure in mg/l	Messwert Lipasestäbchen	Messwert Leerstäbchen
400	Hi	Hi
300	Hi	Hi
200	Hi	Hi
100	233	179
50	81	57
20	33	9
10	Lo	Lo

Es ist ersichtlich, dass Ascorbinsäure zu falsch positiven Messergebnissen führt. Erst geringe Konzentrationen von 10 mg/l haben keinen Einfluss mehr. Deutlich wird auch, dass bei dieser Konzentration das Leerstäbchen keine Färbung zeigt und somit geeignet ist, anzuzeigen, inwieweit Störungen durch Ascorbinsäure vorliegen. Es ermöglicht somit ein Abschätzen der in der Probe enthaltenen Ascorbinsäurekonzentration.

Messungen in den Wursterzeugnisextrakten mit dem Leerstäbchen führten zu stark violetten Verfärbungen des Teststreifens. Die Ascorbinsäurekonzentrationen waren demnach so hoch, dass eine starke falsch positive Störung des Reflectoquant® Lipase – Tests zu erwarten war.

Um dennoch eine Messung von Lipasekonzentrationen in Wursterzeugnisextrakten zu ermöglichen, wurde nach einer Methode zur Elimination der Ascorbinsäure gesucht. Folgende zwei Techniken, deren Ergebnisse in Tabelle 15 gegenübergestellt werden, wurden getestet:

1. Technik: Eliminierung der Ascorbinsäure durch Ascorbatoxidase:

Zubehör:

- Ascorbatoxidase (200 U/ml, Calbiochem 189724)
- Ascorbinsäure – Test der Fa. Merck (Art. 1.16981.0001)

10 U/ml (50 µl/ml) Ascorbatoxidase eliminieren 100 mg/l Ascorbinsäure in 1 min. Laut PRÄNDL et al. (1988) wird für Wursterzeugnisse der Zusatz von 200 – 500 mg Ascorbinsäure/kg empfohlen. Dies entspricht im 1:5 verdünnten Extrakt einer Konzentration von 100 mg/l. Die Zugabe der Ascorbatoxidase wurde für 200 mg/l berechnet (100 µl Ascorbatoxidase auf 1 ml Extrakt). Die Inkubationszeit wurde auf 5 min erhöht, da das Extrakt keine optimalen Reaktionsbedingungen für die Ascorbatoxidase bietet. Anschließend erfolgte sofort die Messung der Lipase im behandelten Extrakt. Parallel wurde ein Leerstäbchen mitgeführt.

2. Technik: Eliminierung der Ascorbinsäure durch Dialyse

Zubehör:

- Dialyseschlauch (Größe: Size 1 Inf Dia 8/32")
- Becherglas (2 l)
- 1l Dialyseflüssigkeit (Probenpuffer)
- Magnetrührer

Für die Durchführung der Dialyse wurden 2,0 ml Extrakt in den vorbereiteten Dialyseschlauch [30 min Kochen in Aqua dest./EDTA (2 mmol/l)] gefüllt und in 1,0 l Dialyseflüssigkeit (Probenpuffer) gegeben. Die Dialyse erfolgte über 3 h auf einem Magnetrührer. Danach wurde die Lipasekonzentration direkt im dialysierten Extrakt gemessen und der Ascorbinsäuregehalt mit dem Leerstäbchen geprüft.

Tabelle 15: Methodenvergleich zur Eliminierung der Ascorbinsäure aus Wursterzeugnisextrakten

Methode	Extrakt		Extrakt mit Ascorbatoxidase		Extrakt nach Dialyse	
	Lipase-stäbchen	Leer-stäbchen	Lipase-stäbchen	Leer-stäbchen	Lipase-stäbchen	Leer-stäbchen
Leberkäse	135	54	27	Lo	26	Lo
Bierschinken	300	165	Lo	Lo	39	13
Jagdwurst	418	379	Lo	Lo	19	Lo
Bockwurst	Hi	Hi	Lo	Lo	26	Lo
Salami	296	25	212	Lo	168	Lo
Knackwurst	380	125	133	Lo	119	19

Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der beiden Methoden zur Eliminierung der Ascorbinsäure aus den Extrakten von Wursterzeugnissen. Demnach erscheint die Ascorbatoxidase geeigneter als die Dialyse. Die 3-stündige Dialyse führte zwar zu einer Abnahme der Ascorbinsäure, aber Restmengen konnten in einzelnen Proben noch mit dem Leerstäbchen erfasst werden. Nach Zugabe der Ascorbatoxidase trat dagegen keine Färbung auf und im Display erschien „Lo“. Ein weiterer Vorteil der Ascorbatoxidase bestand darin, dass der Extrakt bereits nach 5 min zur Lipasemessung zur Verfügung stand.

Zur Überprüfung der Messergebnisse wurden mit den Extrakten von Brüh- und Rohwurst Wiederfindungsversuche durchgeführt. Zuvor erfolgte die Eliminierung der Ascorbinsäure aus den Extrakten mittels Ascorbatoxidase. Die weitere Durchführung der Wiederfindung verlief wie im Kapitel 3.1.3.1/ Arbeitsanweisung 2 beschrieben. Tabelle 16 gibt die Ergebnisse wider.

Tabelle 16: Ergebnisse der Wiederfindung der Standardlipase in Wursterzeugnisextrakten

Probe	zugesezte Lipasekonzentration in $\mu\text{g/l}$	Wiederfindung in %
Bierschinken (Brühwurst)	100	102,6
Knackwurst (Rohwurst)	100	86

Die Wiederfindung in Bierschinken bzw. Brühwürsten ist sehr gut. In Rohwurst dagegen wurden nur ca. 86 % der zugesezten Lipase wieder gefunden. Um den tatsächlichen Lipasegehalt der Probe zu erhalten, muss der Messwert mit einem errechneten Faktor korrigiert werden. Dieser ergibt sich durch folgende Formel: Korrekturfaktor = $1 / \text{Wiederfindung}$. Im Falle der Rohwurst bedeutet das Korrekturfaktor = $1 / 0,86$. Der errechnete Korrekturfaktor beträgt demnach 1,16. Damit kann das Messergebnis in Rohwürsten korrigiert werden. Dieser Korrekturfaktor ist jedoch nicht absolut zu sehen, sondern muss für die jeweiligen Wurstsorten individuell ermittelt werden.

3.1.4 Ergebnisse der Voruntersuchungen

Nachfolgend sind nochmals alle entwickelten Applikationsarten mit ihren Besonderheiten zusammengefasst. Es konnte sowohl für die Messung bakterieller als auch originärer Lipasekonzentrationen Applikationsvorschriften entwickelt werden.

Bakterielle Lipasen in Nährbouillon können nach der in Tabelle 17 dargestellten Applikationsvorschrift gemessen werden. Untersuchungen wurden nur mit der „Lipolytenbouillon“ vorgenommen. Prinzipiell können auch andere Nährbouillons eingesetzt werden, wenn diese mit einem Wiederfindungsversuch geprüft worden sind und keine der bekannten Störsubstanzen in entsprechender Konzentration enthalten sind. Bei besonders lipolytisch aktiven Bakterien empfiehlt sich eine weitere Verdünnung mit sterilem Probenpuffer oder Bouillon. Für das endgültige Ergebnis muss der Messwert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Tabelle 17: Lipasebestimmung in Nährbouillon

Arbeitsschritte	Nährbouillon (Lipolytenbouillon)
Probenmenge	0,25 ml
Puffermenge Lip 2	1,0 ml
Analyse	Eintauchen des Teststäbchens Überschüssige Flüssigkeit abschütteln Eintauchen in Verstärkerreagenz Lip 1 15 min Reaktionszeit Messung mit Reflektometer (Wellenlänge: 570 nm)

In Tabelle 18 wurden die Applikationsvorschriften zur Messung gewebseigener Lipasen in Fleisch (Rind-, Schwein-, Hähnchen- und Kaninchenfleisch), Wursterzeugnissen, Leber sowie Fisch und Fischerzeugnissen zusammenfassend dargestellt. Insgesamt wurden nach diesem Schema größere Mengen der genannten Produkte untersucht. Die ermittelten Messwerte sind im Ergebnisteil (Kapitel 4) dargestellt.

Tabelle 18: Applikationsvorschriften für die Bestimmung von Lipasen in ausgewählten Lebensmitteln tierischer Herkunft

Arbeitsschritte	Proben			
	Fleisch (Rind, Schwein, Hähnchen, Kaninchen)	Wursterzeugnisse (Roh-, Brüh- und Kochwürste)	Leber	Fisch und Fischerzeugnisse
Probenmenge	3 g	3 g	0,5 g	3 g
Vorzerkleinerung mit Schere	ja	ja	nein	nein
Fraktionierte Zugabe des Probenpuffers	ja	ja	nein	nein
Probenpuffer (Lip 2)	6 ml	6 ml	2,0 ml	12 ml
Homogenisierung	Ultra – Turrax: 8000 U/min, 30 sec im Intervall von 1 sec			
Probenpuffer (Lip 2)	6 ml	6 ml	-	-
Zentrifugation	14000 rpm, 10 min, 0 °C (in 2,0 ml Eppendorf – Tubes)			
Extraktgewinnung	eventuell vorhandene Fettschicht mit Spatel abheben, Überstand vorsichtig abpipettieren			
Verdünnung des Extraktes mit Probenpuffer erforderlich	nein	nein	1:500	<u>fettarme</u> rohe Fische (z.B. Kabeljau): nein <u>fettreichere</u> rohe Fische (z.B. Forelle, Hering): 1:10
Eliminierung der Ascorbinsäure erforderlich	nein	ja - <u>Ascorbatoxidase</u> 100 µl auf 1 ml Extrakt, 5 min Inkubation bei 25 °C	nein	nein
Analyse	Eintauchen des Teststäbchens bzw. Leerstäbchens in das Extrakt überschüssige Flüssigkeit abschütteln Eintauchen in Verstärkerreagenz Lip 1 nach 15 min Reaktionszeit Messung mit Reflektometer (Wellenlänge: 570 nm)			
Messergebnis (Lipasekonzentration)	Messwert Teststäbchen – Messwert Leerstäbchen	Messwert auf Display x ggf. Korrekturfaktor	Messwert auf Display x Verdünnungsfaktor	Messwert auf Display x ggf. Verdünnungsfaktor

3.2 Hauptuntersuchungen

3.2.1 Bestimmung bakterieller Lipasen

3.2.1.1 Untersuchungsmaterial

Aufbauend auf den Erfahrungen des Instituts für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig in der Enzymologie wurden für die Eignungsprüfung des Reflectoquant® Lipase – Tests Bakterienstämme ausgewählt, die in früheren Untersuchungen mit dem „Ringagardiffusions-test“ auf Tributyrin – Agar bzw. Tween – Agar nach Ullmann und Blasius (MEYER 1978) deutliche Lipaseaktivitäten aufwiesen. Dabei handelt es sich um typische Vertreter der Verderbnisflora von Erzeugnissen tierischer Herkunft. Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Arbeiten am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig zu ermöglichen, wurden die Abkürzungen zur Bezeichnung der einzelnen Bakterienstämme übernommen. Dadurch können scheinbare Unregelmäßigkeiten bei den Bezeichnungen auftreten. 56 Stämme von 9 verschiedenen Spezies wurden in die Untersuchung einbezogen. Es handelt sich um in Tabelle 19 aufgeführte Stämme:

Tabelle 19: Untersuchte Bakterienstämme

Bakterien-spezies	Herkunft und Stamm-Nr.	Abkürzung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCILL 22/1	Pa 1
	CCIBML D 272/94	Pa 2
	DSM 939	Pa 3
	DSM 50071	Pa 4
	DSM 1128	Pa 5
	DSM 1117	Pa 6
	CCILL 5x	Pa 5x
	CCILL 44x	Pa 44x
	CCILL 35x	Pa 35 x
	CCILL 40x	Pa 40 x
<i>Aeromonas caviae</i>	DSM 30188	Ac 8
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CCILL 9	Ah 1
	CCILL B 1	Ah 2
	DSM 14084	Ah 3
	DSM 4938	Ah 4
	CCILL 32/81	Ah 5
	CCILL 35/11	Ah 6
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCILL 18	Pf 7
	CCILL 38	Pf 8
	CCILL 39	Pf 9
	CCILL	Pf 10
	DSM 2005	Pf 11
	DSM 6147	Pf 12
	DSM 6506	Pf 13
	DSM 6608	Pf 14
	DSM 50090	Pf 15
	DSM 395	Pf 16
	DSM 156	Pf 17
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 30116	Pm 8
	DSM 46227	Pm 9
	DSM 6674	Pm 10
	DSM 4479	Pm 11
<i>Bacillus subtilis</i>	CCILL 33x	Bs 33x
	CCILL 34x	Bs 34 x
	CCILL 12	Bs 12
	CCILL 13	Bs 13

Fortsetzung Tabelle 19

Bakterien-spezies	Herkunft und Stamm-Nr.	Abkürzung	Bakterien-spezies	Herkunft und Stamm-Nr.	Abkürzung
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCILL B +	S.a. 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCIBML CCM 2124	S.e. 11
	CCILL C1 C2	S.a. 2		DSM 20042	S.e. 13
	CCILL Lm 3653	S.a. 3		DSM 3270	S.e. 15
	CCILL B5 SG511	S.a. 4		DSM 1798	S.e. 16
	CCILL var. albus	S.a. 5	<i>Serratia marcescens</i>	DSM 1608	Sm 1
	CCILL H1 var. hominis	S.a. 6		DSM 30121	Sm 2
	CCILL 1591 var. gallinae	S.a. 7		DSM 30126	Sm 4
	CCILL E 56	S.a. 8		CCILL 1	Sm 6
	CCILL Cowan I Protein A	S.a. 9		CCILL 2	Sm 8
	CCILL 6x	S.a. 6x			
	CCILL 25x	S.a. 25x			

CCIBML Culture Collection – Institut für Bakteriologie und Mykologie Leipzig

CCILL Culture Collection – Institut für Lebensmittelhygiene Leipzig

DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

3.2.1.2 Synthese bakterieller Lipasen

Für die Anzüchtung der zu prüfenden Bakterienstämme und die Synthese der Lipasen wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Eine Öse Kulturmaterial wurde in 10 ml Lipolytenbouillon (Rezeptur siehe Kapitel 3.1.2) übertragen und anschließend bei den für die Keime bekannten Optimaltemperaturen von 30 °C (*Aeromonas spp.*, *Serratia marcescens* und *Pseudomonas fluorescens*) bzw. 37 °C (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Proteus mirabilis*) für 24 h inkubiert. Danach wurde wiederum eine Öse der Vorkultur in 10 ml Bouillon überimpft, 72 h bei 30 bzw. 37 °C bebrütet und anschließend als Probe für den Reflectoquant® Lipase – Test eingesetzt.

3.2.1.3 Messung bakterieller Lipasekonzentrationen in Bouillon

0,25 ml der inkubierten Bouillon und 1,0 ml des Probenpuffers Lip 2 wurden gemischt (Messansatz). Das Teststäbchen wurde in den Messansatz eingetaucht, abgeschüttelt und bei 25 °C 15 min inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgte die Messung des Analysestäbchens mit dem Reflektometer. Der Lipasegehalt der Bouillon wird in µg/l auf dem Display

angegeben. Proben deren ermittelte Lipasewerte oberhalb des Messbereichs lagen, wurden mit steriler, lipasefreier Bouillon verdünnt und nochmals in einem neuen Messansatz gemessen. Der Lipasegehalt der Bouillon ergab sich durch Multiplikation des Verdünnungsfaktors mit dem Messwert.

Die Lipasesynthese aller Bakterienstämme wurde drei Mal in verschiedenen Ansätzen untersucht.

3.2.1.4 Bestimmung der Hitzestabilität bakterieller Lipasen mit dem Reflectoquant® Lipase - Test

Ausgehend von den gemessenen Lipasekonzentrationen wurde versucht, aus jeder Speziesgruppe einen besonders lipolytisch aktiven Stamm zur Bestimmung der Hitzestabilität auszuwählen. Zur Untersuchung kamen folgende Stämme: *Aeromonas hydrophila* 4, *Pseudomonas aeruginosa* 5x, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Pseudomonas fluorescens* 9, *Proteus mirabilis* 8, *Staphylococcus aureus* 4 und *Bacillus subtilis* 13. Da die *Staphylococcus epidermidis*- und *Serratia marcescens* – Stämme keine messbaren Lipaseaktivitäten zeigten, konnte deren Thermostabilität nicht bestimmt werden.

Die Überprüfung der Hitzestabilität der Lipasen erfolgte durch Erwärmung der Bouillons (nach 72 h Inkubation) im Wasserbad (Fa. Memmert). 1,5 ml der Proben wurden in 2,0 ml Eppendorf – Tubes pipettiert und je 5 min bei 60, 70 und 80 °C inkubiert. Die Temperaturkontrolle erfolgte in einem zusätzlichen Tube mit Bouillon. Nach Erreichen der entsprechenden Temperatur in den Gefäßen wurde diese 5 min konstant gehalten. Nach Ablauf der Erhitzungszeit wurden die Tubes sofort entnommen und in einem Wasserbad mit 15 °C kaltem Wasser abgekühlt.

Im Anschluss daran wurde die Messung der Lipasekonzentration mit dem Reflectoquant® Lipase – Test vorgenommen.

Diese Untersuchungen wurden im Doppelansatz durchgeführt.

3.2.1.5 Ringagardiffusionstest (RAD – Test)

Der Ringagardiffusionstest stellt eine einfache, zuverlässige Methode dar, mit der lipolytische Aktivitäten erfasst werden können. Dieser Test wurde bisher erfolgreich am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig eingesetzt, um bakterielle Lipaseaktivitäten zu bestimmen.

Als Reaktionsmedien für den Ringagardiffusionstest kamen der modifizierte Tween 60 – Agar nach Ullmann und Blasius (MEYER 1978) und der Tributyrin - Agar zur Anwendung. Der Tween 60 - Agar enthielt 2,0 % Tween 60 (Roth 9133), 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck 1.06067), 0,01 % CaCl_2 (Merck 1.02083) und 98 % D.S.T. (Diagnostik Sensitivity

Test) Agar-Grundsubstanz (Oxoid CM361). Der Tributyrin – Agar bestand aus Tributyrin – Agar – Basis (Merck 1.01957) mit einem Zusatz von 2,0 % Tributyrin (Merck 1.01958).

Die Lipaseaktivität wird auf dem Tween – Agar durch Trübung des Mediums angezeigt. Diese beruht auf einer Salzbildung zwischen den in Tween enthaltenen Fettsäuren und Calcium – Ionen. Auf Tributyrin - Agar führt sie dagegen zu einer Aufhellung des Agars durch den Abbau des Tributyrins.

Im Anschluss an die Sterilisierung der Reaktionsmedien wurden jeweils 20,0 ml des entsprechenden Agars in eine Petrischale (Durchmesser: 88 mm) ausgegossen und 2 sterile Plastikringe (Durchmesser: 10 mm, Seitenrandhöhe: 5 mm) mit einer sterilen Pinzette im Abstand von ca. 3 cm aufgesetzt.

In die zwei Plastikringe wurden 0,4 ml enzymhaltige Probe (sterilfiltrierter Bouillon) aufgebracht. Während der Inkubationszeit reagierten im Probenmaterial befindliche Lipasen mit dem Reaktionsmedium und führten, je nach enthaltenem Substrat, zu einer Trübung bzw. Aufhellung des Nährbodens um die Ringe herum. Diese Zone wurde mit einem Lineal ausgemessen. Die anschließend berechnete Fläche ($A = \pi \cdot r^2$) wurde als Enzymaktivität gewertet.

3.2.1.6 Vergleich der Substratverwertbarkeit verschiedener bakterieller Lipasen

Für diese Versuche wurden sowohl eine kommerziell erworbene Standardlipase aus *Pseudomonas* (Merck, 105389) als auch in „Lipolytenbouillon“ synthetisierte bakterielle Lipasen der Stämme *Aeromonas hydrophila* 4, *Pseudomonas aeruginosa* 5x, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Pseudomonas fluorescens* 9, *Proteus mirabilis* 8, *Staphylococcus aureus* 4 und *Bacillus subtilis* 13 eingesetzt.

Versuche mit der Standardlipase aus *Pseudomonas*

Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe mit verschiedenen Konzentrationen der Standardlipase in „Lipolytenbouillon“ wurden 0,4 ml dieser sterilen Lösung in die Ringe auf dem Tributyrin – bzw. Tween – Agar pipettiert. Parallel dazu erfolgte die Überprüfung der Lipasekonzentration in der entsprechenden Verdünnung mit dem Reflectoquant® Lipase – Test. Die Inkubation der beimpften Agarplatten erfolgte 72 h im Brutschrank (Fa. Memmert) bei 37 °C. Danach wurden wie schon im Kapitel 3.2.1.5 beschrieben, die Platten ausgewertet und die Flächen berechnet.

Versuche mit in „Lipolytenbouillon“ synthetisierten bakteriellen Lipasen

Die Gewinnung der zu untersuchenden bakteriellen Lipasen erfolgte analog dem bereits unter Punkt 3.2.1.2 beschriebenen Vorgehen. Die Rohbouillon mit den synthetisierten Lipasen wurde anschließend mittels Einwegspritze und Spritzenvorsatzfilter (Porengröße: 0,2 µm) filtriert. 0,25 ml des bakterienfreien, enzymhaltigen Filtrats wurden für die Messung

der Lipaseaktivität mit dem Reflectoquant® – Lipase – Test eingesetzt und je 0,4 ml in die zwei Ringe auf den beiden Reaktionsmedien Tributyrin-Agar und Tween – Agar gefüllt.

Um die Sensitivität der beiden Methoden vergleichen zu können, wurde das Filtrat 1:10 und 1:100 mit steriler Bouillon verdünnt und ebenfalls 0,4 ml des verdünnten Filtrats in die Ringe auf den Reaktionsmedien aufgetragen. Diese wurden in einem Laborbrutschrank (Fa. Memmert) bei 30 °C bzw. 37 °C bebrütet. Die Inkubationstemperatur richtete sich dabei nach der für die Anreicherung genutzten Temperatur.

Die Aufklärung – bzw. Trübung der Nährböden zeigte vorhandene Lipaseaktivitäten an. Die Auswertung der entsprechenden Zonen erfolgte nach 72 h.

3.2.2 Bestimmung gewebeeigener Lipasen

3.2.2.1 Untersuchungsmaterial

Für die Bestimmung von Lipasen in Lebensmitteln tierischer Herkunft wurden die in Tabelle 20 aufgeführten Produkte ausgewählt. Um den Praxisbezug herstellen zu können, wurden diese in einem lokalen Supermarkt bzw. bei verschiedenen Fleischereigeschäften erworben.

Tabelle 20: Untersuchte Lebensmittel

Lebensmittelgruppe	n	Ausgewählte Produkte
Leber	14	Schweineleber, frisch
	10	Putenleber, frisch
Fisch	5	Kabeljau, tiefgefroren
	5	Forelle, tiefgefroren
	6	Hering, frisch
Fischerzeugnisse	2	Hering, heiß geräuchert
	1	Makrele, heiß geräuchert
	1	Forelle, heiß geräuchert
Fleisch	29	Geflügelfleisch (Brust, Keule), frisch
	10	Rindfleisch (Hüfte), frisch
	12	Schweinefleisch (Kotelett), frisch
	10	Kaninchenfleisch (Läufe), frisch
Wursterzeugnisse	5	Kochwurst (2 Blutwürste, je 1 Zungen- und Sülzwurst)
	12	Brühwurst (2 Leberkäse, 3 Bierschinken, 2 Jagdwürste, 2 Bockwürste, 1 Knoblauchbrühwurst, 1 Fleischwurst, 1 Kochsalami)
	6	Rohwurst (2 Salami, 2 Knacker, 1 Cervelat-, 1 Schlackwurst)
Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch	2	Schweinehackfleisch
	2	Rinderhackfleisch

3.2.2.2 Probennahme und Extraktgewinnung zur Bestimmung gewebeeigener Lipasen

Für die Bestimmung gewebeeigener Lipasen in Schweine-, Rind-, Kaninchen- und Geflügelfleisch sowie in Fisch, Schweine- und Putenleber wurde das Probenmaterial mit einem Bunsenbrenner abgeflammt, danach die oberste Gewebeschicht mit einer sterilen Schere und Pinzette abgetragen und anschließend die Probe aus der Tiefe entnommen. Die weitere Verfahrensweise entsprach den jeweiligen Applikationsvorschriften (Kapitel 3.1.4/ Tabelle 18) Um einschätzen zu können, ob es sich bei den gemessenen Lipasen um gewebeeigene Lipasen handelt, wurde zusätzlich bei den Fleisch- und Leberproben eine weitere Probe aus der Tiefe des Gewebes entnommen und auf Sterilität geprüft. Es erfolgte ein Direktausstrich auf Blutagar (Nähragar I, Sifin TN 1164 mit 5 % Schafblutzusatz) mit anschließender Bebrütung bei 37°C über 24 h. Bei den Fisch- und Wursterzeugnissen wurde zusätzlich die Anzahl aerob wachsender Keime nach der Referenzmethode der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, vormals § 35 LMBG, L06.00-18 für Fleisch und Fleischerzeugnisse (Anon. 1984) bestimmt.

3.2.2.3 Messung von Lipasen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Die Untersuchung der in Tabelle 20 genannten Lebensmittel erfolgte auf Grundlage der in den Voruntersuchungen entwickelten Applikationsvorschriften (siehe Tabelle 18).

3.2.2.4 Bestimmung der Hitzestabilität der Lipasen in den Gewebeextrakten mit dem Reflectoquant® Lipase – Test

Die Hitzestabilität der Lipasen wurde analog der Beschreibung aus dem Kapitel 3.2.1.4 in den unverdünnten Extrakten der einzelnen Lebensmittel geprüft.

Im Anschluss an die Erhitzung und Abkühlung der Extrakte wurde sofort die Lipasemessung nach dem schon beschriebenen Analyseschema vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Bakterielle Lipasekonzentrationen

Mit dem Reflectoquant® Lipase – Test wurden 56 Bakterienstämme von 9 Spezies untersucht und die synthetisierten Lipasen quantitativ bestimmt. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs und des unbekannten Verteilungstyps, wurde für die Darstellung der Messergebnisse der von BIEBLER et al. (1984) empfohlene Medianwert sowie die Einteilung der Messergebnisse in Quartile verwendet. Der Medianwert gibt die zentrale Tendenz der ermittelten Messwerte an, während die Quartile die Streuung der Messwerte verdeutlichen.

Um eine bessere Übersicht und Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde eine getrennte Darstellung der Quartile (Tabellen 21 bis 28) und der Medianwerte (Abbildungen 2 bis 7) für jede Spezies gewählt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Kruskal - Wallis - H - Test, Duncan - Test).

Der Messbereich des Reflectoquant® Lipase – Tests umfasst 10 bis 400 µg/l. Das Messergebnis „Lo“ wurde in der Auswertung als Wert Null gesetzt, um die Berechnung der Quartile zu ermöglichen.

Tabelle 21: Lipasen der *Pseudomonas fluorescens* – Stämme (Quartile)

Bakterienstamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
Pf 7	3	9 – 27
Pf 8	3	27 – 62
Pf 9	3	32 – 104
Pf 10	3	22 – 43
Pf 11	3	0 – 14
Pf 12	3	0 – 12
Pf 13	3	0
Pf 14	3	0
Pf 15	3	0 – 20
Pf 16	3	0
Pf 17	3	17 – 29
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		Pf 8, Pf 10 : Pf 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16 Pf 9 : Pf 7 bis 17 ³

Tabelle 22: Lipasen der *Staphylococcus aureus* – Stämme (Quartile)

Bakterienstamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
S.a. 1	3	5 – 37
S.a. 2	3	15 – 299
S.a. 3	3	38 – 61
S.a. 4	3	52 – 102
S.a. 5	3	20 – 34
S.a. 6	3	0
S.a. 6 x	3	0 – 12
S.a. 7	3	7 – 13
S.a. 8	3	10 – 17
S.a. 9	3	0
S.a.25 x	3	0 – 13
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		S.a. 2 : S.a. 1, 6, 6x, 7, 8, 9, 25x ³

Tabelle 23: Lipasen der *Bacillus subtilis* – Stämme (Quartile)

Bakterien-stamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
Bs 12	3	18 – 41
Bs 13	3	28 – 73
Bs 33x	3	10 – 30
Bs 34x	3	0 – 30
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		n.s. ²

Tabelle 24: Lipasen der *Aeromonas* – Stämme (Quartile)

Bakterien-stamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
Ac 8	3	9 – 27
Ah 1	3	71 – 124
Ah 2	3	27 – 105
Ah 3	3	79 – 101
Ah 4	3	75 – 99
Ah 5	3	23 – 40
Ah 6	3	5 – 23
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		Ah 6 : Ah 1, 2, 3, 4 Ah 5 : Ah 1, 3, 4 ³

Tabelle 25: Lipasen der *Serratia marcescens* – Stämme Quartile)

Bakterien-stamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
Sm 1	3	0
Sm 2	3	0
Sm 4	3	0
Sm 6	3	0 – 11
Sm 8	3	0
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		n.s. ²

Tabelle 26: Lipasen der *Proteus mirabilis* – Stämme (Quartile)

Bakterien-stamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
Pm 8	3	19 – 48
Pm 9	3	17 – 48
Pm 10	2	27 – 48
Pm 11	3	18 – 47
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		n.s. ²

Tabelle 27: Lipasen der *Pseudomonas aeruginosa* – Stämme (Quartile)

Bakterien-stamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
Pa 1	3	25 – 67
Pa 2	3	9 – 20
Pa 3	3	19 – 52
Pa 4	3	15 – 23
Pa 5	3	38 – 78
Pa 6	3	18 – 36
Pa 5x	3	330 – 535
Pa 35x	3	9 – 79
Pa 40x	3	12 – 36
Pa 44x	3	20 – 40
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		Pa 5x : Pa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 40x, 44x, 35x ³

Tabelle 28: Lipasen der *Staphylococcus epidermidis* – Stämme (Quartile)

Bakterien-stamm	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
S.e. 11	3	0
S.e. 13	3	0
S.e. 15	3	0
S.e. 16	3	0
Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den Stämmen ¹		n.s. ²

¹ Kruskal-Wallis-H-Test² n.s. = $p > 0,05$, d.h. nicht signifikant (n.s.)³ x:y = x signifikant ($p \leq 0,05$) verschieden von y

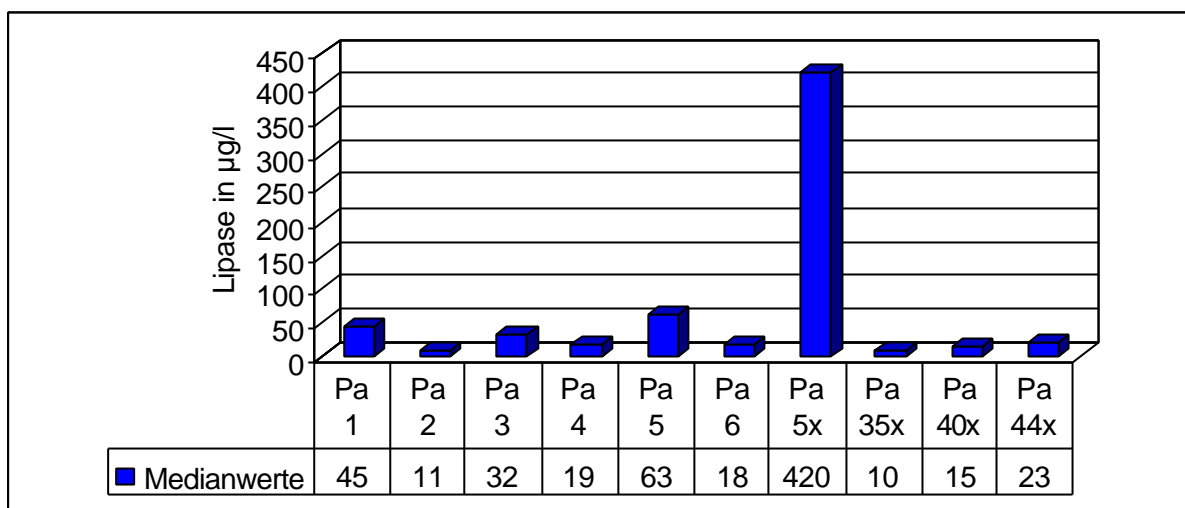
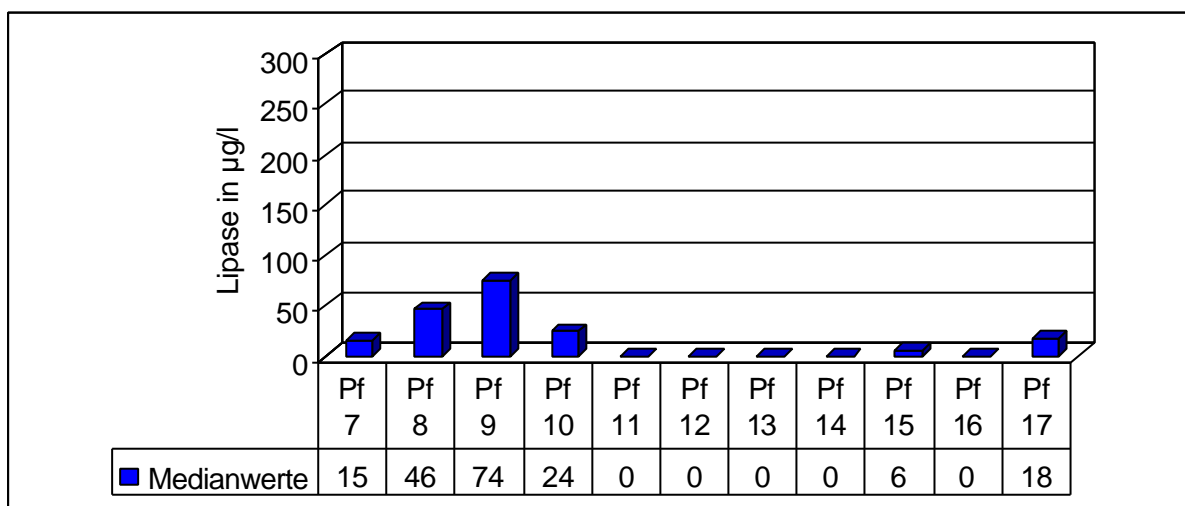
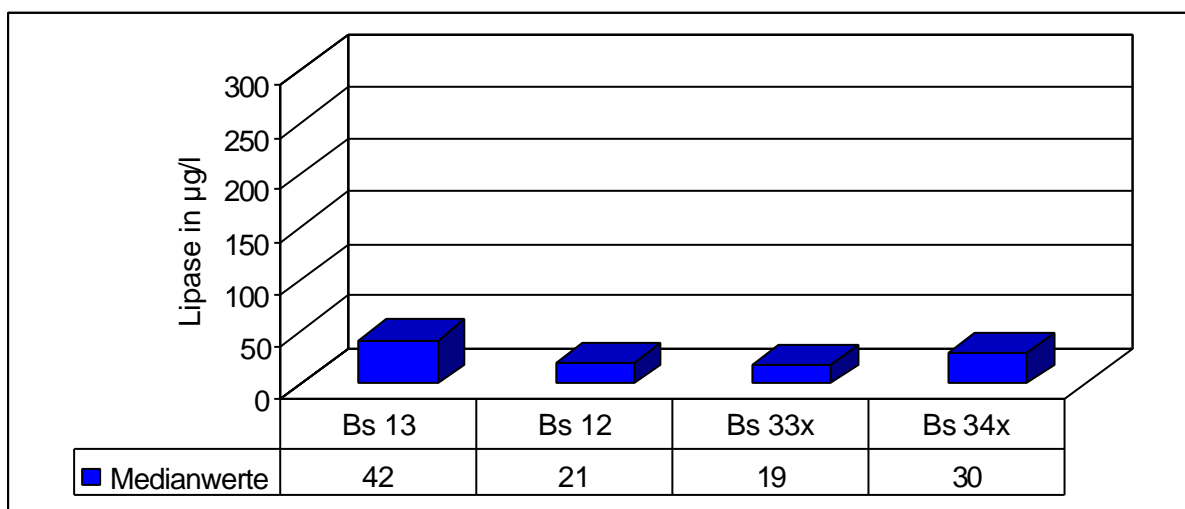
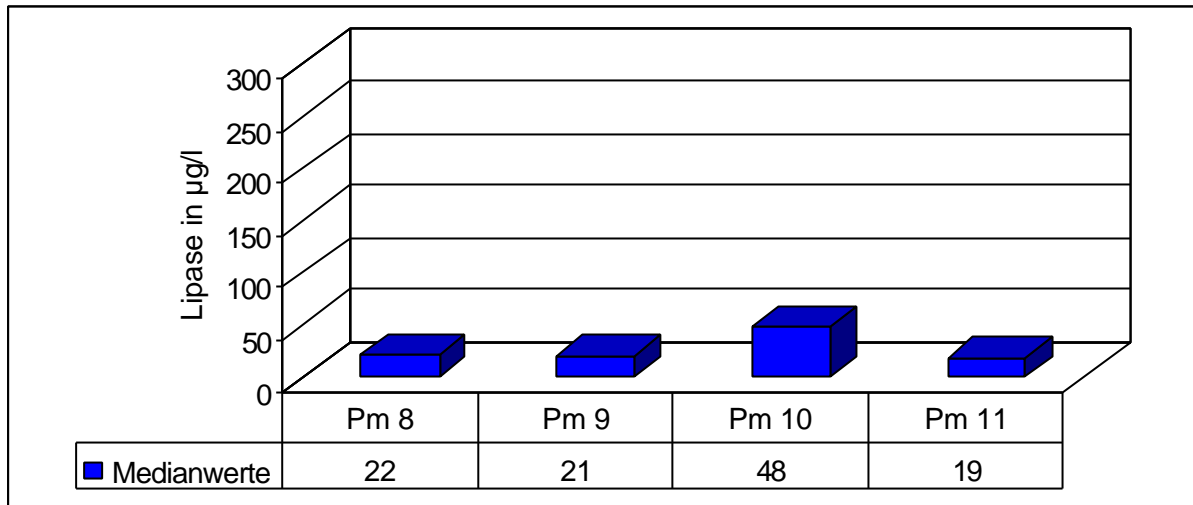
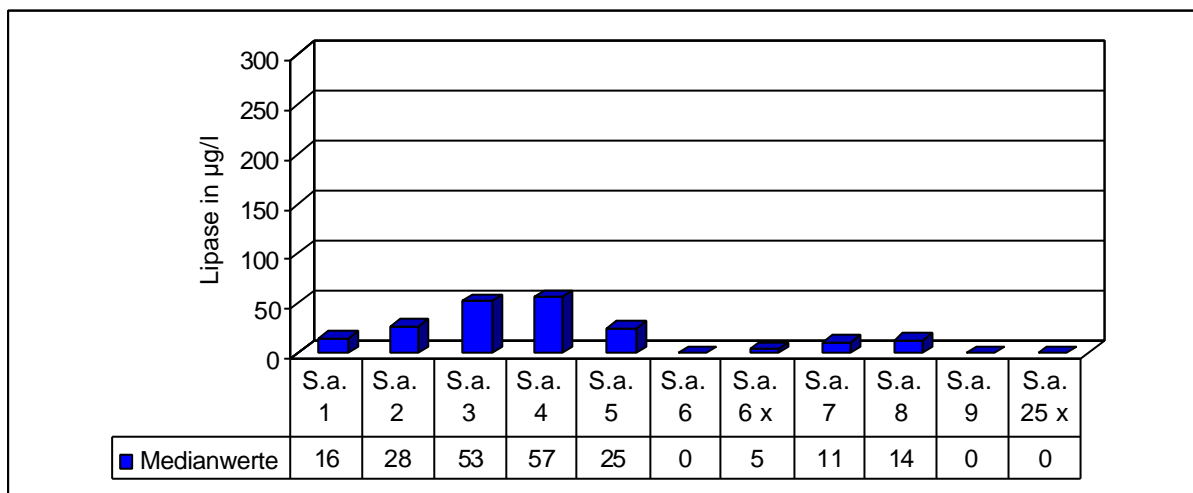
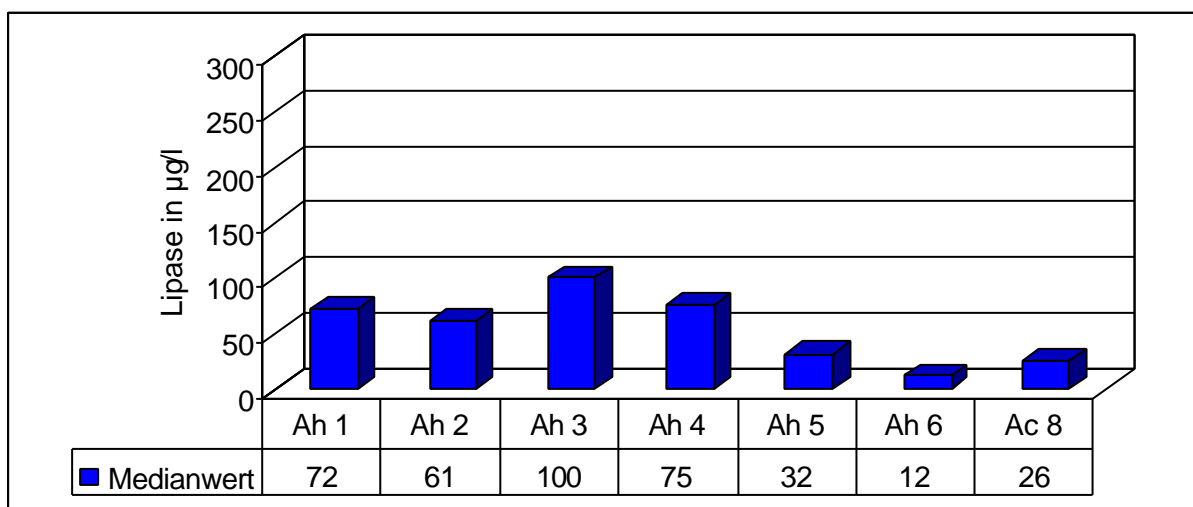
Abbildung 2: Lipasesynthese durch *Pseudomonas aeruginosa* – Stämme (Medianwerte)Abbildung 3: Lipasesynthese durch *Pseudomonas fluorescens* – Stämme (Medianwerte)Abbildung 4: Lipasesynthese durch *Bacillus subtilis* – Stämme (Medianwerte)

Abbildung 5: Lipasesynthese durch *Proteus mirabilis* – Stämme (Medianwerte)Abbildung 6: Lipasesynthese durch *Staphylococcus aureus* – Stämme (Medianwerte)Abbildung 7: Lipasesynthese durch *Aeromonas* – Stämme (Medianwerte)

Alle untersuchten Bakterienstämme der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila* bzw. *caviae* und *Proteus mirabilis* wiesen für den Reflectoquant® Lipase – Test erfassbare Konzentrationen auf. Einige *Pseudomonas fluorescens*- (Pf 13, 14, und 16) und *Staphylococcus aureus*- (S.a. 6, 9, 25 x) Stämme synthetisierten keine bzw. Lipasekonzentrationen, die unterhalb des Messbereiches lagen. Alle geprüften *Staphylococcus epidermidis* und *Serratia marcescens* – Stämme wiesen Lipasekonzentrationen unter 10 µg/l auf (Ausnahme: Sm 6 = 11 µg/l).

Aeromonas hydrophila bildete im Vergleich zu allen anderen untersuchten Spezies signifikant höhere Lipasemengen, während *Serratia marcescens* und *Staphylococcus epidermidis* eine signifikant niedrigere Syntheseleistung als alle anderen Spezies zeigten.

Die getesteten *Pseudomonas fluorescens* – Stämme bildeten signifikant niedrigere Lipasekonzentrationen als die von *Pseudomonas aeruginosa* ($p \leq 0,05$).

Innerhalb der geprüften Bakterienspezies gab es unterschiedliche Syntheseaktivitäten der einzelnen Stämme. Zwischen welchen Stämmen es signifikante Unterschiede gab, wurde in den Tabellen 21 bis 28 aufgeführt. Dabei handelt es sich um *Pseudomonas fluorescens*-, *Staphylococcus aureus*-, *Aeromonas hydrophila*- und *Pseudomonas aeruginosa* – Stämme. Keine Unterschiede bestanden hingegen in der Syntheseleistung der *Bacillus subtilis*-, der *Proteus mirabilis*-, der *Staphylococcus epidermidis*- und der *Serratia marcescens* – Stämme.

Um trotz der unterschiedlichen Syntheseleistungen eine übersichtliche Diskussion zu ermöglichen, wurden die untersuchten Verderbniserreger in 3 Gruppen unterteilt - in Erreger mit starker lipolytischer (>50 µg/l), mittlerer (11 – 50 µg/l) und schwacher bzw. nicht nachweisbarer Syntheseleistung (< 10 µg/l, siehe Tabelle 29). Damit soll jedoch keine Wichtung der Bedeutung für den Verderb vorgenommen werden.

Tabelle 29: Einteilung der Verderbniserreger nach ihrer Syntheseleistung (Medianwerte) nach 72 h Inkubation bei den jeweiligen Optimaltemperaturen

Bakterienspezies	Syntheseleistung für Lipase (Medianwerte) in Lipolytenbouillon		
	starke Syntheseleistung (>50 µg/l)	mittlere Syntheseleistung (11 – 50 µg/l)	schwache bzw. nicht nachweisbare Syntheseleistung (≤10 µg/l)
<i>Aeromonas hydrophila</i> und <i>Aeromonas caviae</i>	Ah1, Ah2, Ah3, Ah4	Ah5, Ah6, Ac8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa5x, Pa5	Pa1, Pa2, Pa3, Pa4, Pa6, Pa40x, Pa44x	Pa35x
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pf9	Pf7, Pf8, Pf10, Pf17	Pf11, Pf12, Pf13, Pf14, Pf15, Pf16

Fortsetzung Tabelle 29

Bakterienspezies	Syntheseleistung für Lipase (Medianwerte) in Lipolytenbouillon		
	starke Syntheseleistung ($>50 \mu\text{g/l}$)	mittlere Syntheseleistung ($11 - 50 \mu\text{g/l}$)	schwache bzw. nicht nachweisbare Syntheseleistung ($\leq 10 \mu\text{g/l}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	S.a.3, S.a.4	S.a.1, S.a.2, S.a.5, S.a.7, S.a.8	S.a.6, S.a.6x, S.a.25x, S.a.9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	S.e.11, S.e.13, S.e.15, S.e.16
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Bs12, Bs13Bs33x, Bs34x	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	Pm8, Pm9, Pm10, Pm11	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	Sm1, Sm2, Sm4, Sm6, Sm8

4.2 Gewebseigene Lipasekonzentrationen

Für die Darstellung dieser Ergebnisse wurde, wie auch bei den bakteriellen Lipasekonzentrationen, der von BIEBLER et al. (1984) empfohlene Medianwert berechnet sowie die Einteilung der Messergebnisse in Quartile vorgenommen.

Die statistische Bearbeitung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests.

In den folgenden Tabellen 30 und 31 sowie in den Abbildungen 8 bis 10 werden die entsprechenden Lipasekonzentrationen dargestellt, wobei die Quartile in den Tabellen und die Medianwerte in den Abbildungen erscheinen.

Während in allen untersuchten nicht erhitzten (rohen) Lebensmitteln (Fisch, Fleisch, Leber, Rohwurst) nach steriler Probenentnahme gewebseigene Lipasen gemessen werden konnten, wurden in erhitzten Produkten (Brüh- und Kochwürste, Fischerzeugnisse) erwartungsgemäß keine nachweisbaren Lipasekonzentrationen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test ermittelt. Eine Ausnahme stellte der Leberkäse mit 27 bzw. 17 $\mu\text{g/kg}$ dar.

Die mikrobiologischen Befunde befinden sich im Anhang.

Tabelle 30: Lipasekonzentrationen in nicht erhitzten Lebensmitteln

Lebensmittelgruppe	Ausgewählte Produkte	n	Lipase in µg/l 1. – 3. Quartil
Fisch	Kabeljau	5	139 – 326
	Forelle	5	1085 – 1452
	Hering	6	858 – 1155
Fleisch	Schweinefleisch	12	19 – 70
	Rindfleisch	10	65 – 107
	Hähnchenbrust	18	93– 153
	Hähnchenkeule	11	179 – 374
	Kaninchenfleisch	10	325 – 460
Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch	Schweinehackfleisch	2	83 - 173
	Rinderhackfleisch	2	79 - 89
Leber	Schweineleber	14	101980 – 153100
	Putenleber	10	39630 - 64880
Wursterzeugnis	Rohwurst	6	167* – 312*

* Korrekturfaktor 1,16 (siehe Wiederfindung Tabelle 16)

Tabelle 31: Lipasekonzentrationen in erhitzten Lebensmitteln

Lebensmittelgruppe	Ausgewählte Produkte	n	Lipase in µg/l
Wursterzeugnis - Brühwurst	Sächsischer Leberkäse	2	27 bzw. 17
	Bierschinken	3	≤ 10
	Jagdwurst	2	≤ 10
	Bockwurst	2	≤ 10
	Fleischwurst	1	≤ 10
	Knoblauchbrühwurst	1	≤ 10
	Kochsalamì	1	≤ 10
Wursterzeugnis - Kochwurst	Blutwurst	2	≤ 10
	Sülze	1	≤ 10
	Zungenwurst	1	≤ 10
Fischerzeugnisse	Makrele, heiß geräuchert	1	≤ 10
	Hering, heiß geräuchert	2	≤ 10
	Forelle, heiß geräuchert	1	≤ 10

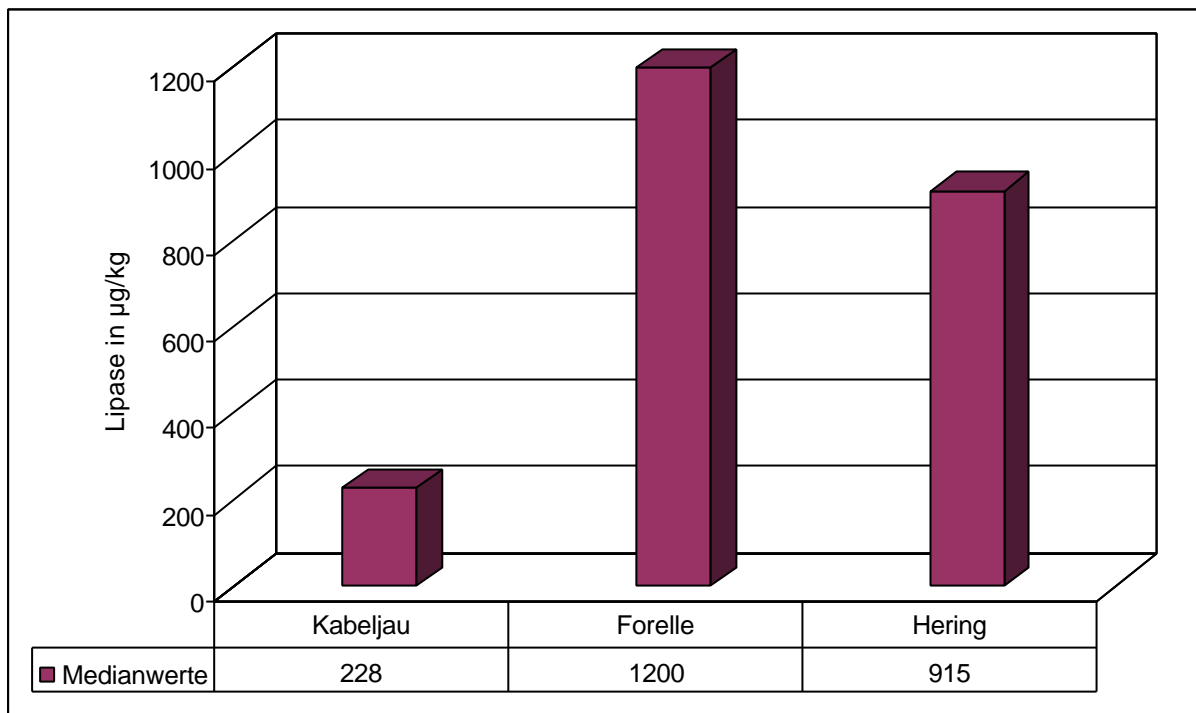
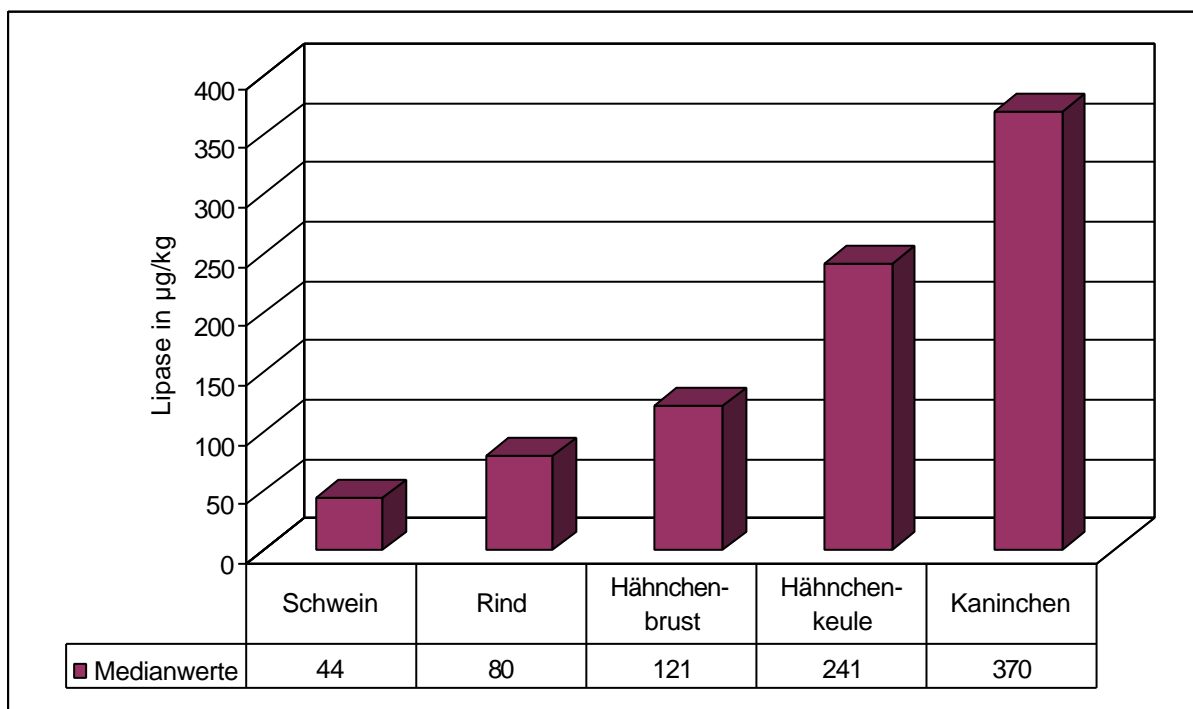
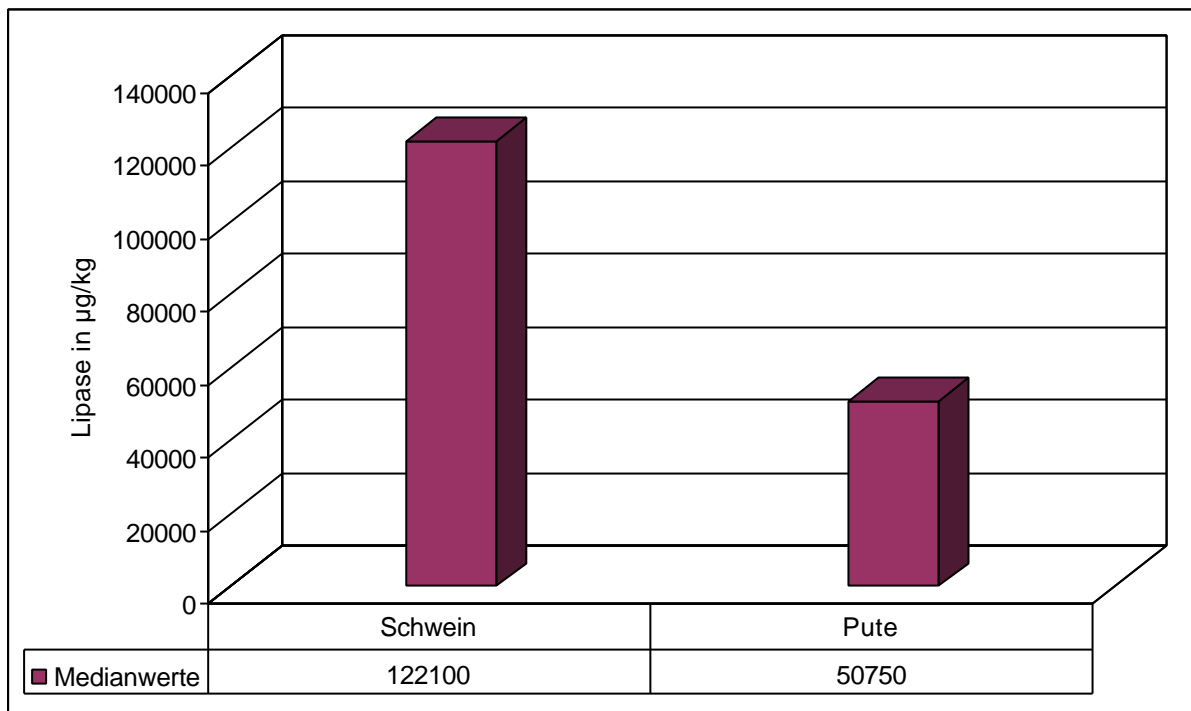
Abbildung 8: Lipasekonzentrationen in $\mu\text{g/kg}$ in rohem Fisch (Medianwerte)Abbildung 9: Lipasekonzentrationen in $\mu\text{g/kg}$ in rohem Fleisch (Medianwerte)

Abbildung 10: Lipasekonzentrationen in µg/kg in roher Leber (Medianwerte)



Die Lipasekonzentrationen der untersuchten Lebensmittelgruppen Fisch, Fleisch und Leber unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

Von den 3 Fischarten wies der fettarme Kabeljau die geringsten Konzentrationen auf. Die fettreicheren Fische Forelle und Hering enthielten ca. 5 – fach höhere Enzymkonzentrationen. Diese Unterschiede erwiesen sich ebenfalls als signifikant ($p \leq 0,05$). Die tierartlichen Abweichungen bei den untersuchten Fleischproben sowie die Differenzen in Hähnchenbrust und Hähnchenkeule sind ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$). Die niedrigsten Lipasewerte wurden in Schweine- und Rindfleisch ermittelt. Kaninchenfleisch enthielt ca. 8 – fach höhere Konzentrationen an Lipase als Schweinefleisch.

Die höchsten Lipasekonzentrationen wurden erwartungsgemäß in Leber gefunden, wobei Schweineleber (Medianwert: 122100 µg/kg) ca. doppelt so hohe Konzentrationen aufwies wie Putenleber (Medianwert: 50750 µg/kg).

4.3 Hitzestabilität bakterieller und gewebeeigener Lipasen

Für die Beurteilung der Hitzestabilität **bakterieller lipolytischer Enzyme** wurden jeweils die aktivsten Stämme der einzelnen Spezies ausgewählt. Die Messwerte in den nicht erhitzten Extrakten entsprachen dabei 100 %.

Da *Staphylococcus epidermidis* und *Serratia marcescens* Lipasekonzentrationen unterhalb des Messbereiches aufwiesen, wurden sie nicht in die Untersuchungen einbezogen.

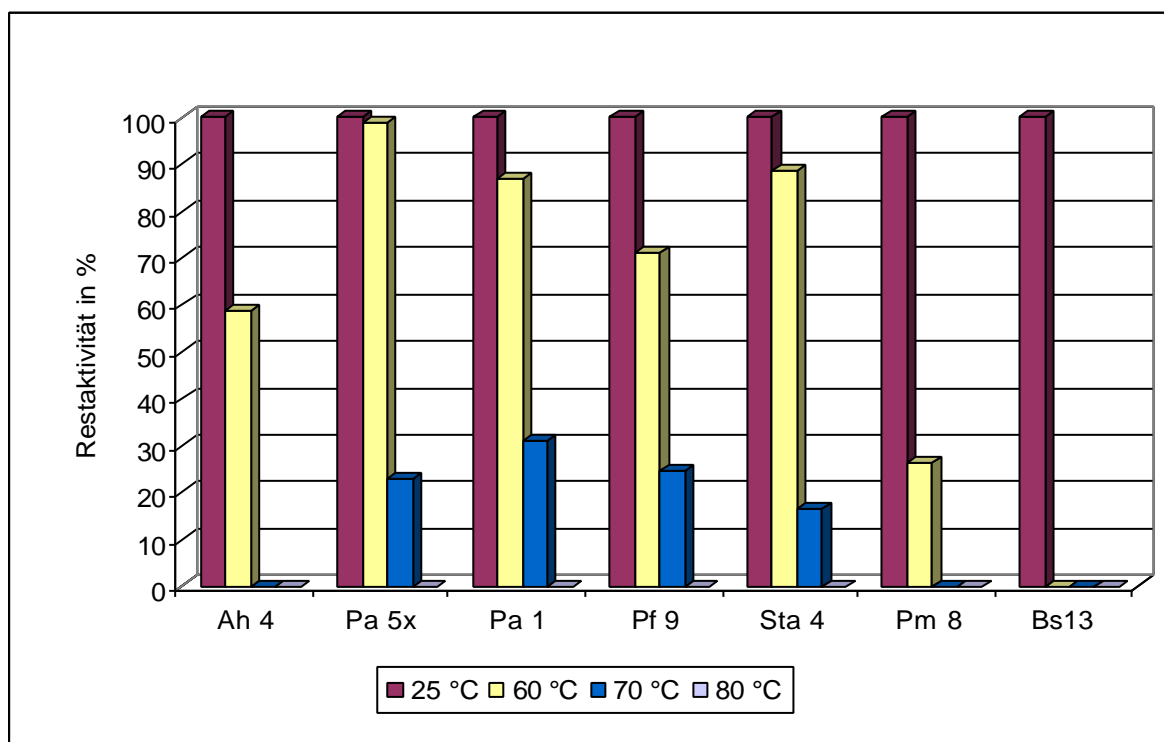
Die Erhitzung bewirkte bei allen untersuchten bakteriellen Lipasen eine Abnahme der Konzentration. Jedoch zeigten die *Staphylococcus aureus* - und *Pseudomonas* - Lipasen während der 5-minütigen Erhitzung bei **60 °C** eine höhere Hitzestabilität als die Lipasen von *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis* und *Bacillus subtilis*, die nach der Erhitzung nur noch 59 % bzw. 26 % der Ausgangskonzentration aufwiesen. Die Lipasen von *Bacillus subtilis* 13 erwiesen sich als besonders hitzelabil. Bereits nach 5 min bei 60 °C waren sie nicht mehr erfassbar.

Nach Erwärmung der Lipasebouillon auf **70 °C** wurden bei *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis* und *Bacillus subtilis* keine Konzentrationen mehr gemessen. Bei allen anderen Stämmen wurden jedoch lipolytische Restaktivitäten zwischen 16 und 31 % registriert.

Temperaturen von **80 °C** über 5 min führten bei allen Keimen zu nicht mehr nachweisbaren Lipasekonzentrationen.

Diese Einzelergebnisse sind in der Abbildung 11 nochmals graphisch dargestellt.

Abbildung 11: Hitzestabilitäten bakterieller Lipasen nach 5-minütiger Erhitzung

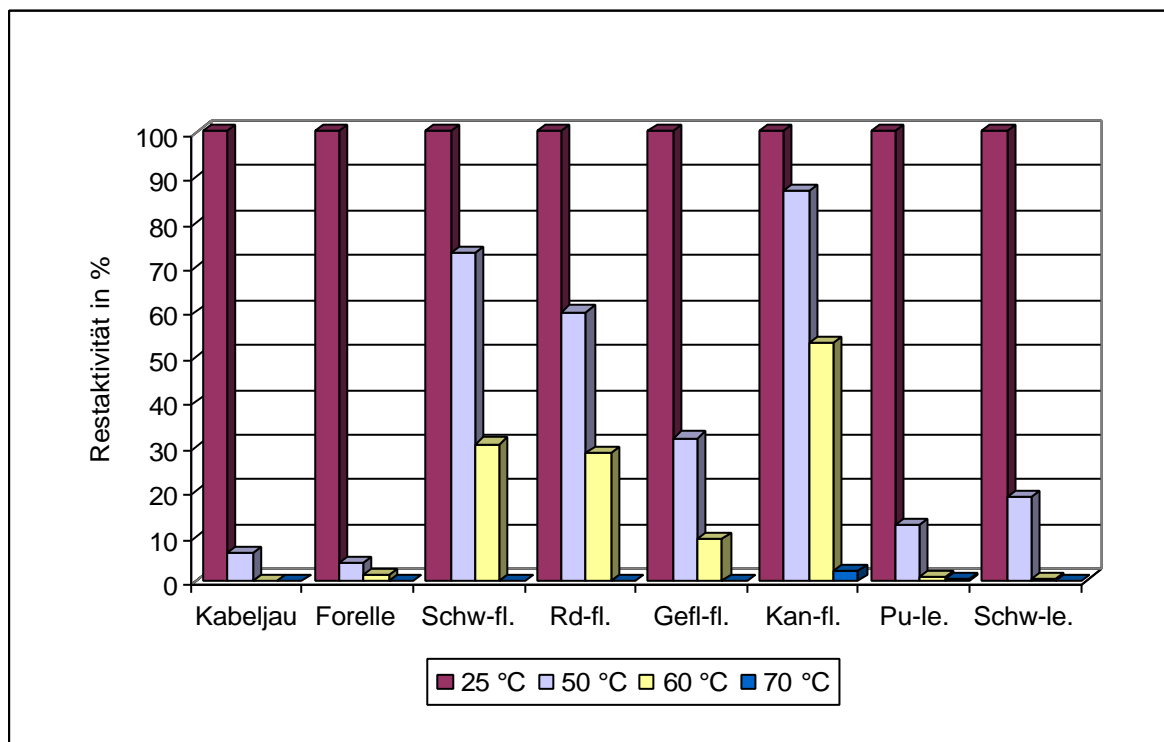


Wie aus der Abbildung 12 hervorgeht zeigten die **gewebseigenen Lipasen** in Fisch, Fleisch und Leber bereits nach einer 5-minütigen Erhitzung bei **50 °C** einen starken Verlust ihrer Konzentrationen. Besonders die Fischlipasen erwiesen sich als hitzelabil. So wurden in Kabeljau nur noch 6 % und in Forelle 4 % der Ausgangswerte gemessen. Auch die Lipasekonzentration in den Leberproben nahm stark ab (Schweineleber/Schw-le. 19 % und Putenleber/Pu-le. 12 % der Ausgangswerte). Als etwas stabiler nach Erhitzung auf 50 °C erwiesen sich die Fleischlipasen. Die Lipasen aus Kaninchenfleisch (Kan-fl.), Schweinefleisch (Schw-fl.) und Rindfleisch (Rd-fl.) zeigten Restaktivitäten von 87, 73 bzw. 60 %. Geflügelfleischlipasen (Gefl-fl.) waren mit 32 % am hitzelabilsten.

Temperaturen von **60 °C** führten bei allen gewebseigenen Lipasen zu einem weiteren Konzentrationsverlust. Die Fisch- und Leberlipasen zeigten nur noch Restaktivitäten von 1 %, die Fleischlipasen dagegen noch 9 bis 53 %.

Die Erhitzung der Proben auf **70 °C** führte, mit Ausnahme von Puten- und Schweineleber (0,3 bzw. 0,03 %) sowie Kaninchenfleisch (Restaktivitäten 2 %) zu nicht mehr nachweisbaren Lipasekonzentrationen.

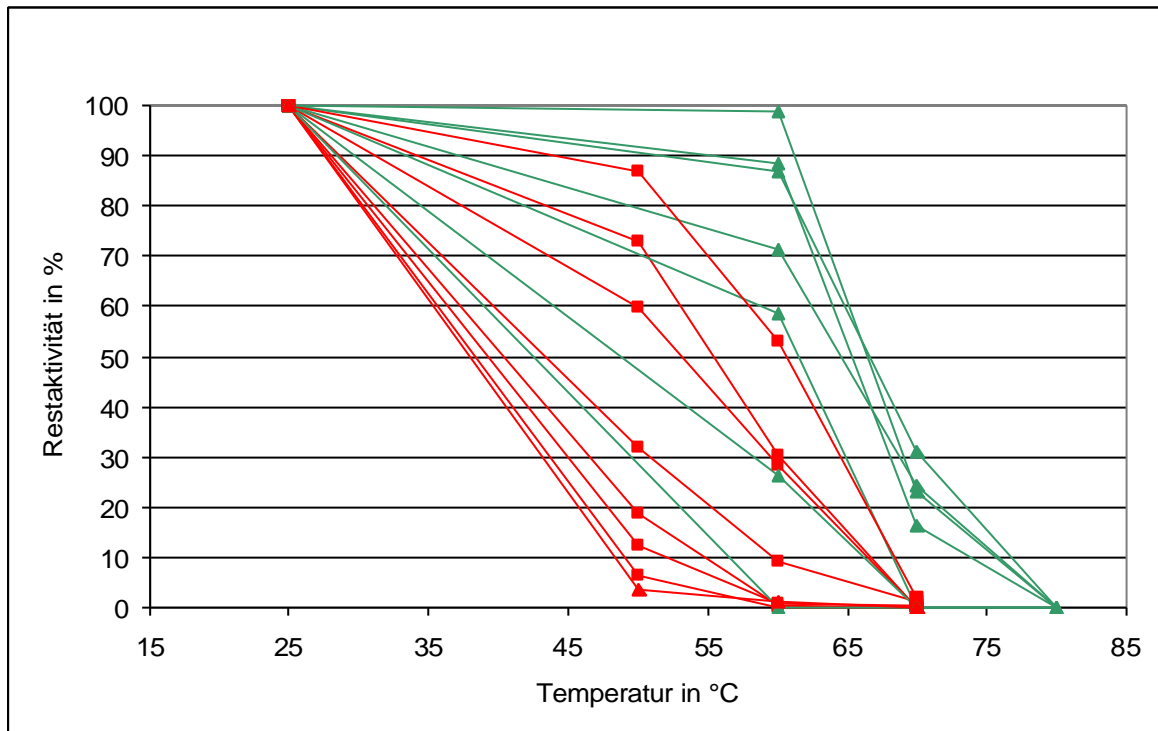
Abbildung 12: Hitzestabilitäten gewebseigener Lipasen nach 5-minütiger Erhitzung



In Abbildung 13 wurden die Hitzestabilitäten der bakteriellen (Ah4, Pa5x, Pa1, Pf9, Pm8, Bs13) und gewebseigenen (Kabeljau, Forelle, Schweinefleisch, Rindfleisch, Geflügelfleisch, Kaninchenfleisch, Putenleber, Schweineleber) Lipasen vergleichend dargestellt. Die

bakteriellen Enzyme sind deutlich hitzestabiler als die gewebs eigenen. Bei der Erhitzungstemperatur von 60 °C konnte Signifikanz ($p \leq 0,05$) festgestellt werden.

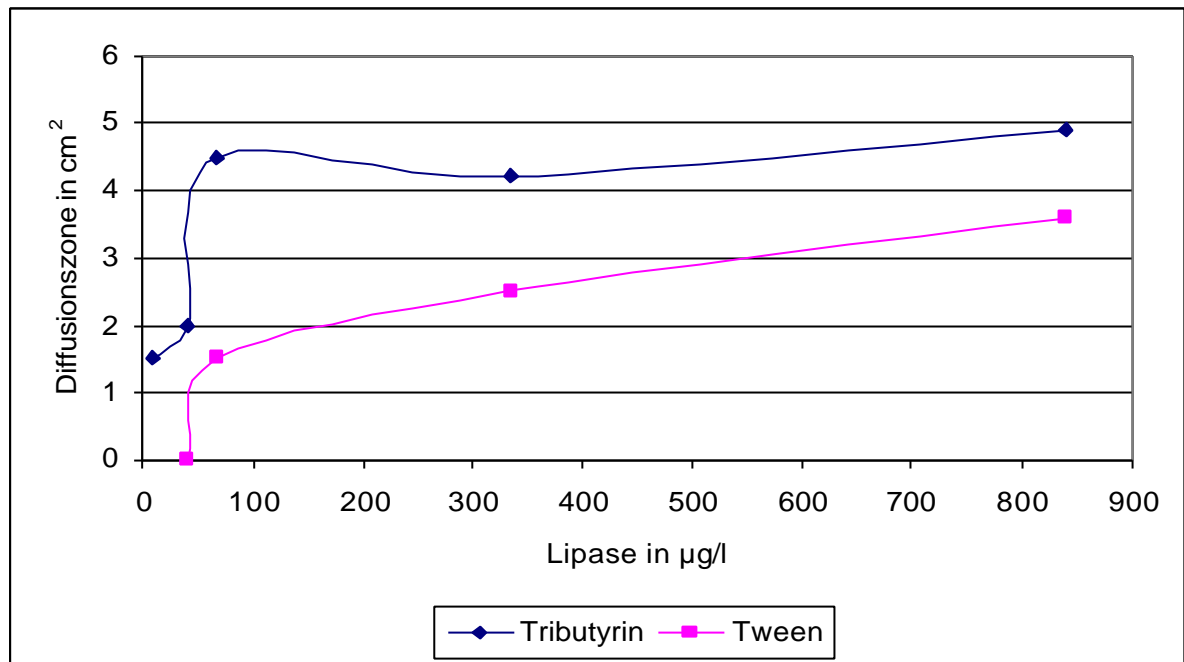
Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der Hitzestabilität bakterieller (grüne Dreiecke) und Gewebslipasen (rote Quadrate)



4.4 Vergleich der Substratverwertung durch verschiedene bakterielle Lipasen

Untersucht werden sollte, in welchem Maße die industriell bzw. unter Laborbedingungen hergestellten bakteriellen Lipasen fähig sind, die Substrate Caprylat, Tributyrin und Tween 60 zu verwerten. Dabei wurden der Reflectoquant® Lipase – Test (Caprylat) und der Ringagardiffusionstest (Tributyrin und Tween 60) eingesetzt.

Die industriell gewonnene Lipase aus *Pseudomonas* (Standardlipase) ist in der Lage, sowohl Caprylat als auch Tributyrin und Tween 60 zu hydrolysieren. Der untersuchte Konzentrationsbereich von 10 bis 1000 µg/l führte auf Tributyrin – Agar zu entsprechenden Aufklarungszonen von 1,5 bis 5,3 cm². Auf Tween 60 – Agar dagegen wurden ab 40 µg/l abwärts keine Lipaseaktivitäten mehr verzeichnet. Die Reaktionszonen fielen im erwähnten Konzentrationsbereich wesentlich kleiner aus als auf Tributyrin (siehe Tabelle 32 bzw. Abbildung 14).

Abbildung 14: Substratverwertung durch Standardlipase aus *Pseudomonas*Tabelle 32: Substratverwertung durch Standardlipase (*Pseudomonas* – Lipase, Merck)

Probe	Ansatz	Substrat: Caprylat	Substrat: Tributyrin	Substrat: Tween 60
		Lipase – Test Lipase in µg/l	Ringagardiffusionstest Lipaseaktivität in cm ²	
Standardenzym Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas</i> (Merck)	1	858	5,3	3,5
	2	823	4,5	3,8
	1	343	4,5	2,5
	2	329	3,8	2,5
	1	69	4,5	1,5
	2	66	4,5	1,5
	1	39	2,0	0
	2	41	2,0	0
	1	10	1,5	0
	2	10	1,5	0

Die unter Laborbedingungen (eigene Herstellung) synthetisierten bakteriellen Lipasen von *Pseudomonas fluorescens* 9, *Pseudomonas aeruginosa* 5x, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Staphylococcus aureus* 4, *Aeromonas hydrophila* 4, *Bacillus subtilis* 13 und *Proteus mirabilis* 8 reagierten stammesspezifisch unterschiedlich auf die einzelnen Substrate. Bis auf *Pseudomonas aeruginosa* 1 und *Proteus mirabilis* 8 verwerteten jedoch alle sowohl Caprylat als auch Tributyrin und Tween 60.

Die für die Durchführung des Ringagardiffusionstests notwendige Filtration führte bei allen Stämmen zu einer Abnahme der Lipasekonzentration. So waren bei *Pseudomonas aeruginosa* 1 und *Proteus mirabilis* 8 nach der Filtration keine Lipasen messbar, bei *Pseudomonas aeruginosa* 5x nur noch 2,1 % bzw. bei *Aeromonas hydrophila* 4 nur noch 10,7 % der Ausgangskonzentration nachweisbar. Den geringsten Konzentrationsverlust in der filtrierten Bouillon zeigten *Staphylococcus aureus* 4 mit 84 % und *Pseudomonas fluorescens* 9 bzw. *Bacillus subtilis* 13 mit 41 % der Ausgangskonzentration. Die Messwerte befinden sich im Anhang.

Die Lipasekonzentration des Stammes *Pseudomonas aeruginosa* 1 im Filtrat konnte zwar mit dem Reflectoquant® Lipase – Test nicht gemessen werden, aber offensichtlich führten dennoch vorhandene Lipasen zu Reaktionen auf dem Tributyrin – Agar (siehe Tabelle 33). Dieser Nachweis gelang für *Proteus mirabilis* 8 nicht.

Auch die Lipasen aller anderen Stämme zeigten eine Präferenz für Tributyrin. Nur *Aeromonas hydrophila* 4 zeigte auf Tween 60 – Agar stärkere Lipaseaktivitäten.

Mit dem Substrat Caprylat wurden besonders bei *Pseudomonas aeruginosa* 5x, *Aeromonas hydrophila* 4 und *Bacillus subtilis* 13 nur geringe Konzentrationen nahe der unteren Nachweisgrenze von 10 µg/l gemessen, während Tributyrin vergleichsweise starke Lipaseaktivitäten anzeigte.

Mit der Verdünnung der Filtrate sollte zusätzlich eine Einschätzung der beiden Tests in Bezug auf die Sensitivität ermöglicht werden.

Das Substrat Caprylat (Reflectoquant® Lipase – Test) erbrachte in den 1:10 und 1:100 verdünnten Filtraten keinen Lipasenachweis, während er mit Tributyrin (RAD – Test) in der 1:10 Verdünnung bei allen Bakterienstämmen gelang und mit Tween 60 (RAD – Test) bei *Staphylococcus aureus* 4 und *Aeromonas hydrophila* 4. Selbst in der Verdünnung von 1:100 kam es bei *Staphylococcus aureus* 4 zu nachweislichen Aktivitäten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Substratverwertung unter Laborbedingungen synthetisierter bakterieller Lipasen

Bakterien- stämme	Ansatz	Unverdünntes Filtrat			1:10 verdünntes Filtrat			1:100 verdünntes Filtrat		
		Lipase – Test	Ringagardiffusionstest		Lipase – Test	Ringagardiffusionstest		Lipase – Test	Ringagardiffusionstest	
		Lipase in µg/l	Lipaseaktivität in cm ²		Lipase in µg/l	Lipaseaktivität in cm ²		Lipase in µg/l	Lipaseaktivität in cm ²	
		Substrat: Caprylat	Substrat: Tributyrin	Substrat: Tween 60	Substrat: Caprylat	Substrat: Tributyrin	Substrat: Tween 60	Substrat: Caprylat	Substrat: Tributyrin	Substrat: Tween 60
Pf 9	1	46	2,5	1,5	0	1,5	0	0	0	0
	2	61	2,0	2,0	0	1,5	0	0	0	0
Sta 4	1	26	2,5	1,8	0	2,3	0	0	1,5	0
	2	28	3,1	2,5	0	2,0	1,5	0	1,5	0
Pa 5x	1	10	2,0	0	0	1,5	0	0	0	0
	2	15	2,0	0	0	1,5	0	0	0	0
Ah 4	1	16	3,1	4,5	0	2,0	2,5	0	0	0
	2	11	2,5	3,8	0	2,0	2,5	0	0	0
Bs 13	1	12	1,5	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	10	2,0	1,5	0	1,5	0	0	0	0
Pa 1	1	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0
Pm 8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5 Diskussion

Die Wirkung von Lipasen in Lebensmitteln tierischer Herkunft beeinflusst wesentlich die produktspezifischen Eigenschaften bzw. die Qualität fettreicher Lebensmittel und deren Haltbarkeit. Dabei spielen, wie schon im Literaturteil ausführlich erläutert, sowohl gewebs-eigene (originäre) Lipasen der verschiedenen tierischen Gewebe als auch mikrobiell synthetisierte Lipasen eine entscheidende Rolle.

Um den Einfluss der Lipasen näher charakterisieren zu können, sind entsprechende Mess- bzw. Kontrollmethoden erforderlich. Ein Anliegen dieser Dissertation war es unter anderem, eine Methode zu entwickeln, die eine genaue Erfassung von Lipasen ermöglicht und, aufgrund einer einfachen und schnellen Testdurchführung, für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie sowie –überwachung attraktiv ist.

Wie im Kapitel 2.6 „Methoden zur Bestimmung von Lipaseaktivitäten“, aufgezeigt, existiert bereits eine Vielzahl an Verfahren. Für die Bestimmung bakterieller Lipaseaktivitäten werden häufig Plattentests bzw. Ringagardiffusionstests (RAD – Tests) eingesetzt. Diese Methoden erweisen sich als besonders günstig bei großen Probenzahlen. Da von verschiedenen Autoren (KARNETOVA et al. 1984, KOUKER und JÄGER 1987) festgestellt wurde, dass der Durchmesser der Agarveränderung mit dem Logarithmus der Lipaseaktivität linear korreliert, ist neben der qualitativen Aussage auch eine Quantifizierung der Aktivität möglich. Die untere Nachweisgrenze wird mit 1 nkat angegeben.

Plattentests sind einfach durchführbar, verlässlich und ermöglichen die Verwendung verschiedener Substrate bzw. die Einstellung unterschiedlicher a_w - und pH – Werte. Auch eine Inkubation bei verschiedenen Temperaturen ist möglich, so dass der Test individuell einstellbar ist. Von Nachteil ist jedoch die lange Inkubationszeit (> 24h). Weiterhin scheint diese Methodik zur Erfassung gewebeeigener Lipasen ungeeignet zu sein. Ein Nachweis dieser Lipasen mit der Plattenmethode wurde weder in der Literatur beschrieben noch gelang er in den Versuchen am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig.

Eine der Standardmethoden zur Bestimmung von Lipaseaktivitäten bzw. –spezifitäten ist die so genannte pH – Stat Methode. Sie ist einfach durchführbar, genau, sensitiv und reproduzierbar. Allerdings führen pH – Werte von < 7 zu ungenauen Ergebnissen bzw. die Durchführung des Tests kann nur mit einem Korrekturfaktor erfolgen (GUPTA et al. 2003). Außerdem ist diese Methode als sehr zeit- und arbeitsaufwändig einzuschätzen, was für den Einsatz in der Praxis von Nachteil ist.

Eine andere, ebenfalls sehr häufig erwähnte Technik, stellt die Nutzung von Fettsäureestern mit chromogenen bzw. fluoreszierenden Alkoholkomponenten dar, deren Freisetzung durch Lipasen mit Hilfe von Spektrophotometern bzw. Spektrofluorimetern erfasst wird. Diese

Methode wurde erfolgreich sowohl zur Bestimmung gewebeeigener als auch bakterieller Lipasen eingesetzt. MOTILVA et al. (1992), HERNÁNDEZ et al. (1998) und CLAEYS et al. (2001) wiesen so Lipasen in Schweinefleisch nach, HASLBECK et al. (1985) in Molken- bzw. Eipulver und Gewürzen. MC KELLAR und CHOLETTE (1986) sowie STEAD (1984) erfassten mit dieser Methodik die Lipasen von *Pseudomonas fluorescens* – Stämmen.

Der von der Firma Merck KGaA entwickelte Reflectoquant® Lipase – Test basiert ebenfalls auf einer farbgebenden Reaktion. Die durch Lipasen freigesetzte Alkoholkomponente Indoxyl oxidiert mit einem Tetrazolium – Salz zu einem Formazan – Farbstoff. Der violette Farbstoff wird mit einem Reflektometer bei 570 nm erfasst und ermöglicht eine Quantifizierung der Lipasekonzentration in der Probe. BRAND et al. (2000) untersuchten die Spezifität und die Sensitivität des auf den Teststreifen enthaltenen Substrates Br-, Cl - Indoxylcaprylat gegenüber Lipasen und Esterasen. Sie verglichen das kurzkettige Indoxylacetat mit den mittel- bzw. langkettigen Substraten Br-, Cl - Indoxylcaprylat bzw. Br-, Cl - Indoxylpalmitat unter Verwendung des Reflektometers RQflex®. Lipasen zeigten bei Einsatz des Br-, Cl - Indoxylcaprylates die stärksten Signale gefolgt von Br-, Cl - Indoxylpalmitat. Esterasen dagegen wiesen die höchste Aktivität bei Verwendung des Substrates Indoxylacetat auf. MÜNNICH und HAASMANN (1999) führten ebenfalls Messungen mit Lipase und Esterase unter Verwendung des Reflectoquant® Lipase – Tests durch. Dabei stellten sie fest, dass Lipase 10 - fach empfindlicher angezeigt wird als Esterase. Das bisherige Probenspektrum des Reflectoquant® Lipase – Tests umfasste pasteurisierte und UHT – Milch, Milchprodukte sowie Getreide und Getreideprodukte.

Der Reflectoquant® Lipase – Test gehört, aufgrund seiner kurzen Reaktionszeit (15 min), zu den so genannten Schnelltests. Dies stellt, gegenüber anderen Methoden, einen großen Vorteil dar. Weiterhin ist er durch eine einfache Handhabung gekennzeichnet und erfordert einen geringen Geräteaufwand. Als besonders günstig wurde die Verwendung eines Taschenreflektometers für die Messung der Teststreifen beurteilt, so dass eine Anwendung unter Produktionsbedingungen in der Industrie erleichtert wird.

Ausgehend von dieser Situation wurde der Reflectoquant® Lipase – Test ausgewählt, um Applikationsvorschriften sowohl zur Bestimmung von bakteriellen als auch gewebeeigener Lipasen in Lebensmitteln zu entwickeln und Richtwerte über den Gehalt an gewebeeigenen Lipasen und die Syntheseleistung von Bakterien aufzustellen.

Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen dienten dem Zweck, in zahlreichen Experimenten zu prüfen, ob der Reflectoquant® Lipase – Test für die Messung bakterieller Lipasen in Nährbouillons bzw. gewebeeigener Lipasen in tierischen Geweben geeignet ist. Dabei wurden besonders Extraktgewinnungsmöglichkeiten sowie der Einfluss von Störfaktoren berücksichtigt und Lösungsmöglichkeiten erarbeitet.

Die Untersuchungen mit einer kommerziell erhältlichen, standardisierten Lipase in Lipolytenbouillon (Tabelle 9) ergaben, dass der Reflectoquant® Lipase – Test für die Messung von Lipasen in diesem Medium geeignet ist. Damit wurde die Voraussetzung für die Bestimmung bakterieller Lipasekonzentrationen geschaffen. Prinzipiell können bakterielle Lipasen in allen flüssigen Nährmedien gemessen werden, wenn diese keine Störsubstanzen beinhalten und die Wiederfindung einer zugesetzten standardisierten Lipase gegeben ist. Die für die eigenen Untersuchungen verwendete Bouillon bot optimale Bedingungen für den Test.

Die Anwendung des Reflectoquant® Lipase – Tests in Geweben war vom Hersteller aus nicht vorgesehen, so dass für den Nachweis gewebeeigener Lipasen zunächst eine Extrakt-herstellung nötig war.

Dies erwies sich besonders bei rohen Fleisch und Wursterzeugnissen als schwierig. Das Hauptproblem war dabei zum einen die hohe Wasserbindung der Proben infolge der mechanischen Zerkleinerung bei gleichzeitiger Verwendung eines Puffers mit dem alkalischen pH – Wert von 8,0. Zum anderen sollte der Verdünnungsfaktor möglichst klein gehalten werden, damit ein Lipasenachweis möglich wird. Die fraktionierte Zugabe des Probenpuffers bei der Extrakterstellung (siehe Kapitel 3.1.3.1) ermöglichte eine ausreichende Homogenisierung der Probe mit zunächst der Hälfte des Gesamtpuffervolumens. Durch Zugabe der zweiten Hälfte des Gesamtpuffervolumens konnte die entstandene gelartige, homogene Masse verflüssigt und durch anschließende Zentrifugation ein Extrakt gewonnen werden. Die mit dieser Methodik erhaltene Extraktmenge unterliegt Schwankungen, so dass diese Technik zwar als geeignet, jedoch nicht als optimal bezeichnet werden kann.

Die Extraktgewinnung aus Fisch- und Leberproben gestaltete sich unproblematisch. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass die Probenextrakte entsprechend verdünnt werden müssen.

Weitere Schwierigkeiten bei der Anwendung des Reflectoquant® Lipase – Tests stellten die rote Eigenfarbe, der Fettgehalt und der Ascorbinsäuregehalt der Proben dar. Wie im Kapitel 3.1.3.1 beschrieben, erwies sich die Anwendung eines Leerstäbchens als günstig zur Erfassung der roten Eigenfarbe. Das Fett konnte durch Zentrifugation bei einer Temperatur

von 0 °C entfernt werden. Laut Herstellerangaben führt Ascorbinsäure bei Konzentrationen von 2 mg/l nicht zu Störungen des Reflectoquant® Lipase – Tests. In eigenen Experimenten (Kapitel 3.1.3.4) wurde präzisiert, dass Konzentrationen ab 20 mg/l zu erhöhten bzw. falsch positiven Lipasekonzentrationen führen. Ascorbinsäure ist ein Vitamin, das vorwiegend in Pflanzen vorkommt. Die Konzentrationen in rohem Fisch und Fleisch sind daher verhältnismäßig gering und führen nicht zu einer Störung des Reflectoquant® Lipase – Tests. Die Ascorbinsäurekonzentration für Kabeljau und Regenbogenforelle wurde beispielsweise in der Literatur mit 2 und 2,9 mg/100 g angegeben (OSTERMEYER 2001), für Schweinefleisch und Rindfleisch mit 2,2 und 9,1 mg/100 g (KOLB et al. 1989). Durch die weitere Verdünnung der Proben bei der Extrakterstellung kann ein Einfluss durch Ascorbinsäure ausgeschlossen werden. Leber enthält höhere Vitamin C – Konzentrationen im Bereich von 30,8 mg/100 g (KOLB et al. 1989). Da aber aufgrund der hohen Lipasekonzentrationen des Organs eine Verdünnung von 1:500 nötig ist, kann die Ascorbinsäure auch hier vernachlässigt werden. Wursterzeugnisse enthalten, im Gegensatz zu rohem Fleisch und Fisch, z.T. erhebliche Mengen an Ascorbinsäure, da sie als Antioxidanzmittel eingesetzt wird. Dabei werden Konzentrationen von 200 – 500 mg/kg zugegeben (PRÄNDL 1988), die das Messergebnis stark beeinflussen. Der Reflectoquant® Lipase – Test ist daher nur nach Eliminierung der Ascorbinsäure aus dem Extrakt verwendbar.

In dieser Arbeit wurden die Dialyse des Extraktes und die Verwendung von Ascorbatoxidase als Möglichkeiten zur Eliminierung der Ascorbinsäure aus den Proben vorgestellt. Die relativ preiswerte Variante der Dialyse erwies sich als sehr zeitaufwändig und nicht ausreichend effektiv. Nach 3 h konnten immer noch störende Ascorbinsäurekonzentrationen nachgewiesen werden, weshalb diese Methode als ungeeignet eingestuft wurde. Mit der preisintensiveren Möglichkeit der Ascorbatoxidase konnten schon nach 5 min Reaktionszeit keine störenden Konzentrationen mehr bestimmt werden, weshalb diese Variante für die Untersuchungen favorisiert wurde.

Alle Extrakte wurden, wie bereits die Bouillon, mit Wiederfindungsversuchen geprüft, indem definiert zum jeweiligen Probenextrakt zugesetzte Konzentrationen einer kommerziellen Lipase gemessen werden mussten.

Mit den Voruntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Reflectoquant® Lipase – Test geeignet ist, sowohl bakterielle als auch gewebeeigene Lipasen in Fisch, Fleisch, Wursterzeugnissen und Leber zu messen. Damit steht erstmals ein Test zur Verfügung, der die Untersuchung von Lebensmitteln tierischer Herkunft auf Lipasen innerhalb kurzer Zeit ermöglicht. Bei der Beurteilung der Messergebnisse mit dem Reflectoquant® Lipase – Test muss jedoch berücksichtigt werden, dass die lipolytischen Reaktionen des Tests bei einem Puffer pH – Wert von 8 ablaufen. Wie aus der Literatur hervorgeht, gibt es Lipasen, deren

optimaler pH – Wert im sauren Milieu liegt. Der pH – Wert von Lebensmitteln tierischer Herkunft ist ebenfalls schwach sauer. Kritisch anzumerken ist, dass mit diesem Test nur im neutralen und alkalischen Bereich wirksame Lipasen erfasst werden.

Hauptuntersuchungen

Bestimmung bakterieller Lipasekonzentrationen

Für die Bestimmung bakterieller Lipasekonzentrationen wurden Stämme folgender 9 Bakterienspezies eingesetzt: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* und *Serratia marcescens*.

Bei den Stämmen handelt es sich um Verderbniserreger, die bereits in frühere Untersuchungen zu Lipaseaktivitäten am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig mit einbezogen worden sind. Die Untersuchungen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test dienten zum einen der Überprüfung, inwieweit bakterielle Lipasen das Substrat Br-, Cl-Indoxylcaprylat verwerten können und zum anderen der Quantifizierung des Synthesepotentials der einzelnen Stämme für Lipase unter Optimalbedingungen. Um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die Keime in der Lipolytenbouillon über den gleichen Inkubationszeitraum und bei ihren Optimaltemperaturen von 30 bzw. 37 °C angezüchtet. Die Untersuchungen wurden, zeitlich versetzt, drei Mal durchgeführt.

In zahlreichen Publikationen wird immer wieder die lipolytische Potenz der Pseudomonaden, und Aeromonaden betont (KALOGRIDOU-VASSILIADOU 1984, STEAD 1986, RODERIGUEZ-FERNANDEZ et al. 1992), was mit den eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte.

Das Substrat Br-, Cl - Indoxylcaprylat wurde von allen *Pseudomonas aeruginosa* – Stämmen hydrolysiert, während bei verschiedenen *Pseudomonas fluorescens* – Stämmen keine Lipasekonzentrationen nachgewiesen werden konnten. KOPP (1997) stellte ebenfalls höhere Ausgangsaktivitäten der *Pseudomonas aeruginosa* – Lipasen im Vergleich zu *Pseudomonas fluorescens* – Lipasen bei optimalen Wachstumstemperaturen fest. Dies könnte auf mangelnde Synthese oder auf das Unvermögen zur Hydrolyse des Substrates zurückzuführen sein. Untersuchungen von KORDEL et al. (1991) zeigen, dass die von ihnen getestete *Pseudomonas* – Lipase maximale Aktivitäten gegen C8 – Fettsäure-Ester aufwies. MC KELLAR und CHOLETTE (1986) sowie BRAND et al. (2000) setzten ebenfalls erfolgreich ein Caprylat zur Bestimmung extrazellulärer Lipaseaktivitäten bei *Pseudomonas fluorescens* ein. Caprylate scheinen ein günstiges Substrat zur Bestimmung von *Pseudomonas* – Lipasen zu sein, so dass ein fehlender Nachweis bei einigen *Pseudomonas fluorescens* – Stämmen eher auf eine mangelnde Synthese zurückzuführen sein dürfte.

Zumal auch berücksichtigt werden sollte, dass die Lipasesynthese stark von der Inkubationstemperatur abhängig ist. Die optimale Wachstumstemperatur des Keimes muss dabei nicht gleichzeitig die optimale Synthesetemperatur sein. So stellte ANDERSSON (1980) in seinen Untersuchungen mit *Pseudomonas fluorescens* fest, dass die Lipaseproduktion dieses Keimes nicht direkt mit dem Bakterienwachstum korreliert. Die höchste Syntheseleistung beobachtete er bei Temperaturen von 8 °C, während bei der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C wesentlich geringere Lipasekonzentrationen ermittelt wurden. Auch BUCKY et al. (1987a) machten diese Beobachtung bei *Pseudomonas fluorescens*. Hier war die Lipaseproduktion in Vollmilch bei 4 °C 25 % höher als bei 10 °C. Dieser Umstand könnte die Ursache für die geringen Lipasekonzentrationen vieler *Pseudomonas fluorescens* – Stämme in den eigenen Untersuchungen sein, da sie bei Temperaturen von 30 °C inkubiert wurden.

WALTMAN II et al. (1982) charakterisierten die enzymatische Aktivität von 48 *Aeromonas hydrophila* – Isolaten mit Hilfe des API ZYM Systems. Dabei wurden bei allen *Aeromonas hydrophila* – Stämmen hohe Aktivitäten einer Caprylat – Lipase bestimmt. Im Gegensatz dazu wurden Butyrat –Esterase und Myristat – Lipase zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz und mit schwachen Reaktionen nachgewiesen. Dies erklärt die vergleichsweise hohen Lipasekonzentrationen, die in den eigenen Untersuchungen mit dem ebenfalls auf Caprylat basierenden Reflectoquant® Lipase – Test ermittelt wurden. Caprylat scheint damit besonders geeignet für den Nachweis von *Aeromonas* – Lipasen, deren Aktivitäten immer wieder im Zusammenhang mit Verderbniserscheinungen in Milch und Milcherzeugnissen genannt werden.

Die Fähigkeit der Staphylokokken zur Lipasebildung ist bereits hinreichend bekannt. Von den 11 getesteten *Staphylococcus aureus* – Stämmen wiesen daher in den eigenen Untersuchungen 9 deutliche Lipasekonzentrationen auf, die in den Messbereich des Tests fielen. MURAOKA et al. (1982) untersuchten unter anderem auch die Substratspezifität einer *Staphylococcus aureus* – Lipase, die Triacylglycerole mit den Fettsäuren Laurinsäure, Caprinsäure, Buttersäure und Caprylsäure besonders gut hydrolysierte. Im Zusammenhang mit der Freisetzung freier Fettsäuren in Wurst durch Staphylokokken wurde durch TALON und MONTEL (1997) deren lipolytische Aktivität gegenüber verschiedenen Fettsäureestern getestet. Sie stellten fest, dass die extrazellulären Konzentrate der Staphylokokkenstämme *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus warneri* und *Staphylococcus saprophyticus* besonders gegen p-Nitrophenylester aus Butyrat, Caproat und Caprylat aktiv waren. In Übereinstimmung mit den eigenen Messergebnissen sind Fettsäureester mit Caprylat demnach auch für *Staphylococcus aureus* – Lipasen ein geeignetes Substrat.

Bei den Stämmen von *Staphylococcus epidermidis* und *Serratia marcescens* wurden nur geringe bzw. keine Lipasekonzentrationen gemessen. Wie bereits im Literaturteil erwähnt, können Lipasen verschiedener Bakterien Substratspezifitäten aufweisen. Autoren, die z.B. Lipaseaktivitäten bei *Serratia marcescens* nachwiesen (SINGH et al. 1976, SEVERINA und BASHKATOVA 1981, BRAUN et al. 2001), setzten Medien aus Butteröl oder Kokosöl bzw. Tributyrin ein. Untersuchungen zur Lipaseaktivität von *Staphylococcus epidermidis* wurden mit den Substraten Tributyrin und Tween 60 durchgeführt (KOPP 1997). Eine mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis von *Serratia marcescens* – bzw. *Staphylococcus epidermidis* - Lipasen könnte das Unvermögen der Spaltung des Substrates Br-, Cl-Indoxylcaprylat sein.

Von Bedeutung könnte auch der Zeitfaktor bei der Testdurchführung sein. Für die Reaktion zwischen Lipase und Substrat stehen 15 min zur Verfügung, die für diese Lipasen eventuell zu kurz sein könnten. In den Versuchen von BRAUN (2001) traten bei *Serratia* erst nach 17 d Inkubation bei 7 °C sichtbare lipolytische Reaktionen auf.

Die untersuchten *Bacillus subtilis* – Stämme synthetisierten nach 72 h Inkubation bei 37 °C Lipasekonzentrationen zwischen 19 und 42 µg/l. Einige Autoren weisen ebenfalls auf lipolytische Aktivitäten verschiedener *Bacillus subtilis* - Stämme hin (SUGIHARA et al. 1991, KALOGRIDOU-VASSILIADOU 1992, LESUISSE et al. 1993) und setzten unter anderem Fettsäureester aus Caprylsäure als Substrat ein. LESUISSE et al. (1993) ermittelten höchste Aktivitäten einer *Bacillus subtilis* - Lipase gegen p – Nitrophenyl - Caprylat und SUGIHARA et al. (1991) erhielten ebenfalls die höchste hydrolytische Aktivität gegen das Substrat Tricaprylin. Demnach scheint auch für den Nachweis von *Bacillus subtilis* – Lipasen das im Reflectoquant® Lipase – Test enthaltene Br-, Cl - Indoxylcaprylat ein ideales Substrat zu sein.

Die Fähigkeit von *Proteus mirabilis* zur Lipasesynthese wurde von verschiedenen Autoren (HAUKE 1967, FEHLHABER UND SCHEIBNER 1974, KOPP 1997, BRAUN 2002) bereits erwähnt. Dies wurde auch mit den Messungen des Reflectoquant® Lipase – Tests bestätigt. Alle 4 untersuchten *Proteus mirabilis* – Stämme synthetisierten Lipase in einem Konzentrationsbereich von 19 – 38 µg/l (Medianwerte). Sie sind damit ähnlich aktiv wie die *Bacillus subtilis* - Stämme unter den eingesetzten Milieubedingungen.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden:

- 77 % der untersuchten Stämme waren lipolytisch aktiv und in der Lage, das Substrat Br-, Cl - Indoxylcaprylat zu hydrolysieren (Tabellen 21-28).
- Die Syntheseleistungen der einzelnen Stämme einer Bakterienspezies unterschieden sich z.T. gravierend voneinander. Eine herausragende Syntheseleistung mit mehr als 50 µg/l Lipase zeigten in den eigenen Untersuchungen jeweils die zwei *Pseudomonas*

aeruginosa - und *Staphylococcus aureus* – Stämme Pa 5 und 5x bzw. S.a. 3 und 4 sowie der *Pseudomonas fluorescens* – Stamm Pf 9 und die vier *Aeromonas hydrophila* – Stämme Ah 1, 2, 3 und 4.

- Die Mehrzahl der untersuchten Bakterien zeigte Syntheseleistungen zwischen 10 und 50 µg/l. Dazu gehörten 3 *Aeromonas*-, 7 *Pseudomonas aeruginosa* –, 4 *Pseudomonas fluorescens*-, 5 *Staphylococcus aureus* – Stämme sowie alle *Bacillus subtilis* - und *Proteus mirabilis* – Stämme.
- Schwache bzw. nicht nachweisbare Lipasekonzentrationen wiesen 6 von 11 *Pseudomonas fluorescens* – Stämmen auf, 1 von 10 *Pseudomonas aeruginosa* -Stämmen, 4 von 11 *Staphylococcus aureus* - Stämmen und alle der *Serratia marcescens* - bzw. *Staphylococcus epidermidis* – Stämme.

Die dreimalige Anreicherung und Messung bakterieller Lipasen führte bei einigen Bakterienstämmen trotz gleicher Kultivierungsbedingungen zu Abweichungen der Syntheseleistung. Besonders gravierend waren diese bei *Staphylococcus aureus* 2, *Pseudomonas fluorescens* 9 *Pseudomonas aeruginosa* 5x und *Aeromonas hydrophila* 2 BOOTH (2002) beschreibt in seiner Publikation die Möglichkeiten der Stressadaptation verschiedener Bakterien. Unter anderem sind sie in der Lage, bestimmte Stoffwechselleistungen, wie z.B. die Enzymsynthese, zu reduzieren, ohne jedoch das Wachstum einstellen zu müssen. Möglicherweise stellten die Lagerung der Kulturen im Kühlschrank bei 4 °C (einhergehend mit Substratabbau und abnehmender Feuchtigkeit) bzw. die Kryokonservierung für einige Bakterien besondere Stressfaktoren dar, die sich in einer Reduzierung der Lipasesynthese äußerten.

Bestimmung gewebeeigener Lipasekonzentrationen

Im Zusammenhang mit dem Verderb von Lebensmitteln wird oft auf die dominierende Rolle von Bakterien und ihren enzymatischen Eigenschaften wie z.B. Lipase- und Proteasesynthese hingewiesen. Über die Beteiligung von gewebeeigenen Lipasen an Verderbnisprozessen existieren wenig ausführliche Angaben. Ebenso gibt es kaum Angaben über die normalen Lipasegehalte verschiedener tierischer Gewebe. Mit Hilfe des Reflectoquant® Lipase – Tests gelang es, eine Vielzahl verschiedener Fleischsorten sowie Fisch und Leber zu untersuchen und somit Anhaltspunkte für normale gewebeeigene Lipasegehalte zu geben.

Die mit Abstand höchsten Lipasekonzentrationen wurden erwartungsgemäß in den stoffwechselintensiven Lebergeweben von Schwein und Pute (Medianwerte 122 mg/kg bzw. 51 mg/kg) gefunden. Damit können Angaben von TAIPA et al. (1992) konkretisiert werden, die Organe wie Lunge, Leber, Milz und Niere als lipasereich beschreiben.

Als eine Ursache von Qualitätsminderungen bei Fischen wird immer wieder die Fischmuskellipolyse erwähnt (SHEWFELT 1981). Bisher erfolgte der Nachweis gewöhnlich über die Messung freier Fettsäuren bzw. über kolorimetrische Methoden. Mit dem Reflectoquant[®] Lipase – Test konnten erstmals quantitative Angaben zum Lipasegehalt in verschiedenen Fischen gemacht werden.

Die in der Rückenmuskulatur von Fischen ermittelten Lipasekonzentrationen reichten von 228 µg/kg (Medianwert) bei Kabeljau bis zu 1200 µg/kg (Medianwert) bei Forellen. Heringe wiesen mit 915 µg/kg einen etwas geringeren Lipasegehalt als Forellen auf.

Die Ergebnisse stehen in engen Zusammenhang mit dem Fettgehalt und dem Aufbau der Muskulatur der entsprechenden Fische. Der Kabeljau gehört beispielsweise zu den Magerfischen, die, wie bereits im Literaturteil erwähnt, ihre Fette hauptsächlich in der Leber speichern. Forelle und Hering dagegen zählen zu den fettreicheren Fischen, deren Fettspeicherung vorwiegend in der Muskulatur erfolgt. Außerdem ist der Aufbau der Fischmuskulatur von Bedeutung für den Gehalt an Lipasen. Die Fischmuskulatur wird in die lipidreiche dunkle und die lipidarme weiße Muskulatur unterteilt. Den Hauptbestandteil bildet die weiße Muskulatur, die für spontane, schnelle Fortbewegungen notwendig ist. Die dunkle Muskulatur für langes, ausdauerndes Schwimmen kann bis zu einem Viertel der Gesamtmuskulatur ausmachen und ist besonders bei pelagischen Fischen wie dem Hering ausgeprägt (OSTERMEYER 2001). Studien zu den Enzymaktivitäten in den beiden Muskeltypen indizieren in der dunklen Muskulatur stärkere lipolytische Aktivitäten als in der weißen (SHEWFELT 1981). BOSUND und GARNOT (1969 b) wiesen bei einer 12 wöchigen Lagerung von Fischen bei -15 °C in dunkler Muskulatur einen Anstieg freier Fettsäuren von 50 auf 1000 mg/100 g und in heller Muskulatur von 17 auf 280 mg/100 g nach. Damit wird deutlich welches Ausmaß an lipolytischen Aktivitäten selbst im Gefrier Temperaturbereich zu erwarten ist. Dies bestätigen ebenfalls Untersuchungen von GEROMEL und MONTGOMERY (1980), die den Einfluss der Gefrierlagerung auf die Lipaseaktivität bei -11°C, -23°C und -40°C untersuchten. Sie stellten fest, dass bei Temperaturen von -11°C nach 30 Tagen die Lipaseaktivität höher als in den -23 und -40°C – Proben war. Zwischen den -23 und -40°C – Proben bestanden keine Differenzen. Erst nach 120 Tagen wurde auch bei diesen Temperaturen ein Unterschied erkennbar. Weiterhin fanden sie heraus, dass durch einen langsamen Gefrierprozess die Lysosomen zerstört werden und dadurch lysosomale Lipase freigesetzt wird. Durch schnelles Einfrieren kann dieser Vorgang verhindert werden. HARDY et al. (1979) führten die Lipidhydrolyse in gefrorenem Kabeljau ausschließlich auf die Phospholipidhydrolyse zurück, während BOSUND und GARNOT (1969 a) der Meinung waren, dass sie in Hering sowohl auf Lipase- als auch Phospholipaseaktivitäten beruht.

Über die postmortale Aktivität gewebeeigener Enzyme wie Lipasen und Proteasen in Fleisch ist, wie auch HERNÁNDEZ et al. (2004) betonen, kaum etwas bekannt. Untersuchungen wurden bisher besonders in Zusammenhang mit der Herstellung gereifter Fleisch-erzeugnisse durchgeführt (MOLLY et al. 1997, TOLDRA und FLORES 1998, COUTRON-GAMBOTTI und GANDEMER 1999).

MOLLY et al. (1997) verglichen die Freisetzung freier Fettsäuren in einem sterilen Fleisch – Fett - Gemisch mit der Freisetzung aus dem gleichen Gemisch unter Zusatz verschiedener Starterkulturen. Sie wiesen nach, dass die Lipolyse bei der Rohwurstreifung hauptsächlich durch fleischeigene Enzyme verursacht wird.

In den eigenen Messungen der Lipasekonzentrationen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test wurde für Schweinefleisch eine Konzentration von 44 µg/kg (Medianwert) und für Rindfleisch von 80 µg/kg (Medianwert) ermittelt. Bei der Beurteilung der Messwerte ist zu berücksichtigen, dass die lipolytische Aktivität von der Rasse und dem Muskelstoffwechsel abhängig ist (HERNÁNDEZ et al. 1998, CAVA et al. 2004, HERNÁNDEZ et al. 2004).

HERNÁNDEZ et al. (2004) sowie CAVA et al. 2004 untersuchten rassespezifische Unterschiede in der Ausprägung lipolytischer Aktivitäten in Schweinefleisch. Sie fanden heraus, dass der Anteil an saurer Lipase im Schweinefleisch iberischer Rassen höher ist als bei anderen Rassen (z.B. Pietrain, Large Withe). Die Aktivität der neutralen Lipase zeigte nach HERNÁNDEZ et al. (2004) keine Unterschiede zwischen den untersuchten Rassen. CAVA et al. (2004) dagegen stellten rassebedingte Abweichungen fest.

Auch die Untersuchungsergebnisse von ANTEQUERA et al. (1994), die im Schinken iberischer Schweinerassen höhere Anteile an freien Fettsäuren fanden als bei anderen Rassen, decken sich mit diesen Erkenntnissen.

Unabhängig vom Muskelstoffwechsel und der Rasse ist die Aktivität der neutralen Lipase innerhalb der Muskulatur höher als die der sauren Lipase und der Phospholipase (HERNÁNDEZ et al. 1998). MOTILVA et al. (1992) fanden ebenfalls im neutralen bzw. basischen pH - Wertbereich bedeutende Lipaseaktivitäten in der Muskulatur von Schweinen, die sie diesen beiden Enzymen zuschrieben. Da der Reflectoquant® Lipase – Test Lipasen erfasst, die bei einem pH – Wert von 8,0 aktiv sind, repräsentieren die ermittelten Lipasekonzentrationen einen großen Teil lipolytischer Aktivitäten in der Muskulatur. Nicht berücksichtigt werden mit diesem Test saure Lipasen, deren optimaler pH – Wert zwischen 4,5 und 5,5 liegt sowie Phospholipasen. Neben der neutralen Lipase werden diese Lipasen von MOTILVA et al. (1992) und TOLDRA und FLORES (1998) als Hauptmuskelenzyme bezeichnet.

Über Lipaseaktivitäten in Rindfleisch finden sich nur wenige Informationen. MOLLY et al. (1997) beobachteten lediglich, dass die lipolytischen Aktivitäten in Rohwurst aus

Schweinefleisch höher sind als in Rohwurst aus Rindfleisch. Die eigenen Messungen ergaben jedoch für Rindfleisch höhere Lipasekonzentrationen als für Schweinefleisch. Möglicherweise beruhen diese Differenzen darauf, dass mit dem Reflectoquant® Lipase – Test nicht alle Lipasen erfasst werden.

Kaninchen- und Geflügelfleisch gehören zu den Fleischsorten mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Sie gelten daher als besonders empfindlich gegenüber Verderb durch Ranzigkeit bei längerer Lagerung, z.B. in gefrorenem Zustand. Die Messungen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test ergaben Werte (Medianwerte) um die 370 µg/kg für Kaninchenfleisch sowie 121 µg/kg für Hähnchenbrust und 241 µg/kg für Hähnchenkeule. Verglichen mit den Ergebnissen in Schweine- und Rindfleisch handelt es sich um relativ hohe Messwerte. Die ermittelten Werte in Kaninchen- und Hähnchenfleisch deuten auf starke lipolytische Aktivitäten in den Geweben hin. Diese begünstigen, bedingt durch die Freisetzung freier mehrfach ungesättigter Fettsäuren aus Triglyceriden, zusätzlich den Verderb durch Lipidoxidation.

Dass in Kaninchenfleisch bedeutende lipolytische Vorgänge ablaufen, bestätigen die Ergebnisse von ALASNIER et al. (2000 a). Nach 7 tägiger Lagerung bei 4 °C stellten sie eine starke Zunahme an freien Fettsäuren (von 2-10 auf 11-32 mg/100g Muskel) fest. Dabei stieg besonders der Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Leider werden aber keine Angaben zu sensorischen Veränderungen des Fleisches gemacht. Weiterhin stellte diese Arbeitsgruppe die Lipolyse in Relation zu dem jeweiligen metabolischen Muskelfasertyp. Sie bestimmten die Konzentrationen an freien Fettsäuren in glykolytischen und oxidativen Muskeltypen. Ihre Beobachtungen stimmten mit denen überein, die CURRIE und WOLFE (1977) sowie SKLAN et al. (1983) in Hähnchen – bzw. Putenfleisch gemacht hatten. Die Zahl der freien Fettsäuren war im glykolytischen Muskel (Brust) niedriger als im oxidativen bzw. intermediären Muskel (Schenkel). Die in den eigenen Untersuchungen ermittelten unterschiedlichen Lipasekonzentrationen in Brust- und Oberschenkelmuskulatur von Hähnchen können daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf unterschiedliche Muskelfasertypen und deren Energiestoffwechsel zurückgeführt werden. Während glykolytische Muskelfasern (Brust) Kohlenhydrate wie das Glycogen als Energiequelle nutzen, werden für die Energieversorgung oxidativer Muskelfasern (Schenkel) Fettsäuren verstoffwechselt. Dies spiegelt sich auch in einer besseren kapillären Durchblutung, dem höheren Gehalt an Triacylglycerolen und einer höheren Lipaseaktivität in oxidativen Muskelfasern wieder. ALASNIER et al. (2000 b) stellten sowohl in Brust – als auch in der Schenkelmuskulatur von Hähnchen eine deutliche Fetthydrolyse fest, die sich in einer Zunahme der freien Fettsäuren niederschlug. Sie beobachteten in den ersten 3 Tagen der

Kühlagerung eine relativ schnelle Zunahme der freien Fettsäuren, die dann bis zum 14. Tag langsam abnahm.

Im Unterschied zu den bisher diskutierten Lipasekonzentrationen in rohem Fleisch bzw. Fisch und Leber, sind Lipasewirkungen in rohen Wursterzeugnissen, wie Rohwürsten und luftgetrockneten Schinken, zum großen Teil erwünscht. Wie schon im Literaturteil ausführlich erläutert (Kapitel 2.2.3) sind lipolytische Veränderungen für das typische Aroma der entsprechenden Produkte notwendig, können jedoch auch zu Qualitätsabweichungen führen. Die verhältnismäßig hohen gemessenen Lipasekonzentrationen bestätigten daher die Erwartungen. Besonders die länger gereiften Rohwurstsorten wie Salami und Schlackwurst zeigten einen etwa doppelt so hohen Lipasegehalt wie die schnell gereiften Knackwürste. Dies ist möglicherweise durch die zusätzliche bakterielle Lipasesynthese während der Reifezeit zu erklären.

In Brühwürsten wurden, mit Ausnahme von 2 Proben, keine Lipasen nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen in engem Zusammenhang mit denen zur Ermittlung der Thermostabilität von Lipasen und sollen daher dort diskutiert werden.

Die mikrobiologische Untersuchung der Fleischproben von Schwein, Rind und Hähnchenbrust erbrachte keinen Keimnachweis, so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei den ermittelten Lipasen um gewebeeigene handelt. Die Proben aus Leber, Fisch und einigen Hähnchenschenkeln sowie Kaninchenfleisch erwiesen sich als keimhaltig (Nachweis nicht differenzierter Keime im Nativausstrich auf Blutagar, siehe Anhang). Aufgrund der Tatsache, dass sich die untersuchten Proben jedoch im frischen bzw. tiefgefrorenen, unverdorbenen Zustand befanden, erscheint eine Beteiligung bakterieller Lipasen als unwahrscheinlich.

Thermostabilität bakterieller und gewebeeigener Lipasen

Eine bedeutende Eigenschaft der Lipasen, besonders im Zusammenhang mit dem Verderb von Lebensmitteln, ist deren Thermostabilität. Die Resistenz gegenüber hohen Temperaturen ermöglicht es ihnen, Erhitzungsprozesse zu überstehen und Lebensmittel nachteilig zu verändern. Aus diesem Grund sind Kenntnisse auf diesem Gebiet von großem Interesse. SCHLEUSENER et al. (1982) beschäftigten sich mit der Modellierung der thermischen Inaktivierung von Enzymen. Sie unterschieden folgende 4 Verlaufsformen:

1. Verlauf gemäß einer Reaktion 1. Ordnung, also linear,
2. im Verlauf der Inaktivierung resultiert ein Knickpunkt,
3. der Inaktivierungsverlauf weist eine Phase der Stimulierung auf,
4. die Inaktivierung verläuft nicht irreversibel, so dass eine Reaktivierung möglich ist.

Die eigenen Untersuchungen beschäftigten sich vor allem mit der Fragestellung, welche Restaktivitäten sind nach 5-minütiger Erhitzung bei verschiedenen Temperaturen zu

erwarten, wie ist der Verlauf des Konzentrationsverlustes und inwieweit bestehen Unterschiede zwischen der Thermoresistenz bakterieller und gewebeeigener Lipasen. Während die Thermostabilität bakterieller Lipasen bereits vielfach von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert wurde, existieren über die Stabilität gewebeeigener nur wenige Publikationen.

Für die Darstellung bakterieller Hitzestabilitäten wurde jeweils der stärkste Stamm einer jeden untersuchten Spezies ausgewählt. Da *Serratia marcescens* und *Staphylococcus epidermidis* keine bzw. sehr geringe nachweisbare Lipasekonzentrationen aufwiesen, wurden sie nicht in die Untersuchung einbezogen.

Bakteriellen Lipasen wird, abhängig von der Spezies, immer wieder eine erhebliche Thermostabilität zugesprochen. Einen umfassenden Einblick über den Einfluss unterschiedlicher Hitzebehandlungen auf die Aktivität von bakteriellen Lipasen gibt die Dissertation von KOPP (1997).

Thermostabile Lipasen verschiedener *Pseudomonas* – Stämme werden besonders im Zusammenhang mit der Pasteurisierung und Haltbarkeit von Milch und Milchprodukten erwähnt (KALOGRIDOU-VASSILIADOU 1984, STEAD 1986, ABAD et al. 1993, SHAH 1994). In den eigenen Untersuchungen wurden diese Beobachtungen bestätigt. So führte die 5-minütige Erhitzung der lipasehaltigen Bouillon auf 60 °C nur zu geringfügigen Abnahmen in der Lipasekonzentration. Selbst bei Temperaturen von 70 °C wurden bei allen *Pseudomonas* – Stämmen noch 20 - 30 % der Ausgangskonzentrationen ermittelt.

Staphylococcus aureus 4 synthetisierte ähnlich hitzestabile Lipasen. Temperaturen von 60 °C bewirkten nur eine geringfügige Abnahme der Lipasekonzentration von annähernd 10 %. Ein Anstieg auf 70 °C bewirkte einen Konzentrationsabfall auf 16 %. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Thermostabilität von *Staphylococcus aureus* – Lipasen. SINGH et al. (1973) fanden Restaktivitäten von mehr als 50 % nach einer 30-minütigen Erhitzung bei 63 °C. MURAOKA et al. (1982) konnten dagegen nach 30 min bei 65 °C keine Aktivitäten mehr nachweisen. Eine Inaktivierung wurde von KOPP (1997) auf Tween 60 bei Temperaturen von 71 bzw. 75 °C beobachtet. Auf Tributyrin – Agar konnten selbst bei 5-minütiger Erhitzung auf 75 °C noch Lipaseaktivitäten beobachtet werden.

Die Lipasen von *Aeromonas* – Stämmen werden in der Literatur ebenfalls als hitzeresistent beschrieben. So zeigten zwei von KALOGRIDOU-VASSILIADOU (1984) untersuchte Stämme nach einer Erhitzung auf 63 °C für 30 min nur mäßige Aktivitätsverluste von 29,7 bzw. 18,9 %. Temperaturen von 72 °C für 17 sec führten zu Aktivitätsverlusten von 16,2 bzw. 5,2 %. LAW et al. (1976) beobachteten nach einer Erhitzung von *Aeromonas* – Lipasen auf 63 °C für 30 min Restaktivitäten zwischen 47 % und 93,5 %. Mit keinem der von BRAUN

et al. (1999) durchgeführten Erhitzungsregime (60°C/60min, 65°C/30min, 71°C/15min, 75°C/5min) konnte eine vollständige Inaktivierung der Lipasen erreicht werden. Diese Hitzestabilitäten wurden mit den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt. Zwar gelang es nach 5-minütiger Erhitzung bei 60 °C, noch ca. 60 % der Ausgangskonzentration nachzuweisen, ab 70 °C dagegen war nach 5 min kein Lipasenachweis mehr möglich.

Die Lipasen des *Bacillus subtilis* – Stammes Bs. 13 gehören offensichtlich zu den hitzelabilen. Bereits Temperaturen von 60°C führten nach 5 min zu einer Inaktivierung. Hitzelabile Lipasen von *Bacillus subtilis* - Stämmen wurden auch von LESUISSE et al. (1993) und BRAUN et al. (1999) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ermittelten SINGH et al. (1973) nach 30-minütiger Erhitzung einer *Bacillus subtilis* – Lipase bei 60 °C Restaktivitäten von etwas mehr als 40 %.

Über die *Proteus mirabilis* – Lipasen ist wenig bekannt. Es gibt in der Literatur einige Angaben über die lipolytischen Fähigkeiten dieser Gattung (HAUKE 1967, SCHEIBNER 1970a, KOPP 1997), die Hitzestabilität wurde jedoch nur von KOPP (1997) geprüft. Sie beobachtete einen vollständigen Enzymaktivitätsverlust bei Temperaturen bzw. Inkubationszeiten von 60 °C/60 min, 65 °C/30 min, 71 °C/15 min und 75 °C/5min. Die Erhitzung der Lipasen des Stammes *Proteus mirabilis* 8 führte in den eigenen Untersuchungen nach 5 min bei 60 °C zu einem Konzentrationsverlust von ca. 75 %. Temperaturen von mehr als 70 °C führten zur Inaktivierung der *Proteus mirabilis* - Lipasen.

Zur Hitzestabilität gewebeeigener Lipasen finden sich in der Literatur, wie bereits erwähnt, nur wenige Angaben. Ein direkter Vergleich der Thermostabilität zwischen den Lipasen lebensmittelhygienisch bedeutsamer Verderbniserreger und gewebeeigenen Lipasen wurde bisher nicht vorgenommen, so dass mit dieser Arbeit erstmalig Ergebnisse zu dieser Thematik vorliegen.

Für die Bestimmung der Thermostabilität gewebeeigener Lipasen wurden Probenextrakte aus Fisch, verschiedenen Fleischsorten und Leber eingesetzt. Die parallele Durchführung einer bakteriologischen Untersuchung der Proben sollte einen eventuellen Einfluss mikrobieller Lipasen klären. Alle Proben aus Schweine-, Rindfleisch und Hähnchenbrust sowie einigen Hähnchenschenkeln erwiesen sich als steril, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich die beobachteten Thermostabilitäten auf gewebeeigene Lipasen beziehen. Die Proben aus Kaninchenfleisch, den restlichen Hähnchenschenkeln, Fisch und Leber waren zwar keimhaltig, dennoch wird es sich bei den gemessenen Lipasen weitgehend um gewebeeigene handeln. In der Regel ist erst bei höheren Keimzahlen von 10^7 KbE/g, d.h. nach Auftreten von offensichtlichen Verderbniserscheinungen, mit Lipasesynthesen zu rechnen (BRAUN 2005). Die Produkte waren jedoch frisch und unverdorben.

Bereits die 5-minütige Erhitzung auf 50 °C führte zu Konzentrationsverlusten von ca. 95 % in den Fischextrakten bzw. 80 und 90 % in den Leberextrakten. Die Gewebslipasen aus Fleisch zeigten eine größere Stabilität, wobei der geringste Konzentrationsverlust beim Kaninchenfleisch mit 13 % zu verzeichnen war und der stärkste beim Geflügelfleisch mit 73 %. Mit weiter steigender Temperatur auf 60 °C nahm die Konzentration weiter ab. Ab 70 °C waren in den Fisch- und, mit Ausnahme von Kaninchenfleisch, in allen Fleischextrakten keine Lipasen mehr nachweisbar (siehe Abbildung 12). In Kaninchenfleisch- und Leberextrakten dagegen wurden noch sehr geringe Konzentrationen zwischen 0,03 und 2 % nachgewiesen.

Leider ist ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren aufgrund weniger wissenschaftlicher Publikationen nur bedingt möglich. Einen Hinweis geben die Untersuchungen von CHENG et al. (1985), die humane Lipoproteinlipase (hLPL) bei 40 °C inkubierten. Die Aktivität der hLPL nahm nach 15 min um 50 % ab, was die Hitzelabilität dieses Enzymes dokumentiert. ANDREWS et al. (1987) untersuchten unter anderem die Hitzestabilität der milcheigenen Lipoproteinlipase in Kuhmilch und stellten fest, dass bereits bei Temperatur/Zeit - Kombinationen, die unter denen für die Pasteurisierung lagen, keine Aktivitäten mehr nachgewiesen werden konnten.

Messungen von Lipaseaktivitäten in Schweinefleisch wurden von MOTILVA et al. (1992) vorgenommen. Sie untersuchten auch den Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von Lipasen in Muskel- und Fettgewebe. Alle untersuchten Muskellipasen zeigten bei Temperaturen von mehr als 50 °C eine starke Abnahme in ihrer Aktivität. Temperaturen von 60 °C führten zu einer fast vollständigen Deaktivierung. Diese Beobachtungen sind nahezu identisch mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen.

Der direkte Vergleich der Hitzestabilität gewebeeigener mit der Hitzestabilität bakterieller Lipasen, graphisch dargestellt in der Abbildung 13, zeigt deutliche Unterschiede. Während die gewebeeigenen Lipasen bei Temperaturen von 60 °C bereits starke Konzentrationsverluste aufwiesen, wurden bei den meisten bakteriellen Lipasen noch erhebliche Lipasekonzentrationen gemessen. Damit werden Angaben von SUGIHARA et al. (1991) konkretisiert, die mikrobielle extrazelluläre Lipasen als gewöhnlich hitzestabiler bezeichnen als tierische bzw. pflanzliche Lipasen.

Die unterschiedliche Hitzestabilität gewebeeigener und bakterieller Lipasen ermöglicht eine Abgrenzung dieser voneinander. Lipasen, die in stärker erhitzten Produkten (> 70 °C) nachgewiesen werden, können daher ein Hinweis auf einen hohen Ausgangskeimgehalt mit Lipasesynthese und/oder mangelnde Erhitzung sein. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass in lipasereichen Geweben, z.B. Leber, noch sehr geringe Lipasekonzentrationen nach Erhitzung auf 70 °C nachgewiesen werden können. Für entsprechende Produkte besteht möglicherweise die Gefahr eines schnelleren Verderbs, besonders falls es, in Anlehnung an

die Verläufe der Inaktivierung von SCHLEUSENER et al. (1982), zu einer Reaktivierung von Lipasen nach der Erhitzung kommen sollte.

Brühwürste und Kochwürste zählen zu den erhitzten Wursterzeugnissen, bei deren Herstellung Temperaturen von mehr als 70°C im Kern erreicht werden. Die Ergebnisse der Bestimmung der Thermostabilität erklären den fehlenden Lipasenachweis in diesen Erzeugnissen (siehe Tabelle 31). Durch den Herstellungsprozess wurden alle gewebs-eigenen Lipasen zerstört.

Die in 2 Leberkäseproben dennoch ermittelten geringen Lipasekonzentrationen von 17 bzw. 27 µg/kg könnten im Zusammenhang mit der Verarbeitung von Lebergewebe stehen, deren Lipasen den Erhitzungsprozess überstanden haben. Auch die Beteiligung vorher synthetisierter, hitzestabiler bakterieller Enzyme ist denkbar. Die Wurstproben waren jedoch frisch sowie sensorisch unauffällig und die Gesamtkeimzahl betrug $< 10^2$ KbE/g.

Vergleich der Substratverwertung verschiedener bakterieller Lipasen

Nachdem die Fähigkeit der Hydrolyse von Caprylat bereits durch die Messung bakterieller Lipasen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test nachgewiesen wurde, sollte durch vergleichende Messungen mit den Substraten Caprylat, Tributyrin und Tween 60 Präferenzen verschiedener bakterieller Lipasen untersucht werden.

Zunächst wurde kontrolliert, welche Diffusionszonen durch definierte Lipasekonzentrationen (Standardlipase) auf Tributyrin- und Tween 60- Agar zu erwarten sind (Tabelle 32). Die Eignung von tributyrin- und tweenhaltigen Nährböden für den Lipasenachweis wird immer wieder bestätigt (PICHHARDT 1993, KOPP 1997, BAUMGART 1999, GUPTA et al. 2003, BRAUN 2003).

Die Standardlipase aus *Pseudomonas* bevorzugt deutlich Tributyrin als Substrat. Die Diffusionszonen reichten von 5,3 cm² (840 µg/l) bis 1,5 cm² (10 µg/l). Auf dem Tween 60 – Nährboden konnten unterhalb einer Lipasekonzentration von ca. 40 µg/l keine Lipaseaktivitäten mehr nachgewiesen werden.

Auch die unter Laborbedingungen synthetisierten bakteriellen Lipasen von *Pseudomonas fluorescens* 9, *Pseudomonas aeruginosa* 5x, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Staphylococcus aureus* 4 und *Bacillus subtilis* 13 zeigten eine deutliche Präferenz für Tributyrin. *Aeromonas hydrophila* 4 dagegen hydrolysierte vorrangig Tween 60. Der fehlende Lipasenachweis für *Proteus mirabilis* 8 hängt offensichtlich mit fehlenden Lipasekonzentrationen im Filtrat zusammen. Die Messungen bakterieller Lipasekonzentrationen (siehe Tabelle 26) ergaben für diesen Stamm Konzentrationen zwischen 19 und 48 µg/l, so dass Caprylat zumindest ein geeignetes Substrat ist. Eine Aussage zur Bevorzugung bestimmter Substrate kann aber nicht getroffen werden. In Untersuchungen von KOPP (1997) waren Lipasen von *Proteus*

mirabilis nicht in der Lage Tributyrin zu spalten. Die Hydrolyse von Tween 60 gestaltete sich stammesspezifisch unterschiedlich.

Vergleicht man die Messergebnisse der synthetisierten bakteriellen Lipasen mit denen der Standardlipase, fällt auf, dass die Reaktionszonen auf Tributyrin bei 4 von 6 Spezies auf höhere Lipasekonzentrationen schließen ließen als tatsächlich mit dem Reflectoquant® Lipase – Test (Substrat: Caprylat) ermittelt wurden. Caprylat scheint also für *Pseudomonas aeruginosa* 5x, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Staphylococcus aureus* 4 und *Aeromonas hydrophila* 4 zwar ein geeignetes Substrat für den Lipasenachweis zu sein, aber mit Tributyrin kann ein sensitiverer Nachweis erfolgen. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Untersuchungen mit den verdünnten Filtraten der 6 Bakterienspezies (siehe Tabelle 33) und der Befund von *Pseudomonas aeruginosa* 1, wo nur mit Tributyrin Lipase nachgewiesen werden konnte. Bei *Staphylococcus aureus* 4 gelang mit Tributyrin – Agar ein Lipasenachweis noch im 1:100 verdünnten Filtrat. Die Reaktionen von *Pseudomonas fluorescens* 9 und *Bacillus subtilis* 13 entsprachen in etwa denen der Standardlipase.

Auffällig bei den Untersuchungen zur Präferenz bestimmter Substrate war die starke Abnahme der Lipasekonzentration im Filtrat. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Zellbindung verschiedener Lipasen sein, die unter anderem für *Staphylococcus aureus* (RUZIN und NOVICK 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (MISSET et al. 1994) und *Yarrowia lipolytica* (PEREIRA-MEIRELLES et al. 2000) bereits nachgewiesen wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bereits für viele Lipasen bekannte Substratspezifität auch für die in den eigenen Untersuchungen verwendeten bakteriellen Lipasen bestätigt wurde. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass mit dem Reflectoquant® Lipase – Test und dem Substrat Caprylat ein schneller Lipasenachweis erfolgen kann. Sensitiver reagiert jedoch der RAD – Test mit dem Substrat Tributyrin bei Inkubationstemperaturen von 30 bzw. 37 °C.

Die vergleichenden Untersuchungen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test und dem RAD – Test zeigen auch nochmals die Vorteile und Nachteile des jeweiligen Tests auf.

Der Reflectoquant® Lipase – Test führt innerhalb von 15 min zu einem Messergebnis. Er ist einfach durchführbar, besonders bei flüssigen Proben wie z.B. Bakterienbouillons oder Milch. Gewebseigene Lipasekonzentrationen in Fleisch-, Fisch-, Leber- und Wursterzeugnis-Proben sind nach entsprechender Vorbereitung ebenfalls bestimmbar. Die untere Messbereichsgrenze ist 10 µg/l. Das Messgerät zeigt Konzentrationen bis 400 µg/l an. Durch Verdünnung der Proben können jedoch auch höhere Konzentrationen quantifiziert werden. Nachteile des Reflectoquant® Lipase – Tests bestehen in der Störanfälligkeit gegenüber bestimmten Stoffen wie Ascorbinsäure etc. (siehe Seite 36) und der Tatsache, dass die Messung nur bei einem pH – Wert von 8,0 und mit dem Substrat Br-, Cl - Indoxylcaprylat

möglich ist. Eine Messtemperatur von 25 °C wird vom Hersteller in den Anwendungshinweisen empfohlen. Bei abweichenden Temperaturen müssen die Messergebnisse mit einem Faktor korrigiert werden.

Der RAD – Test ermöglicht die Nutzung der Vorteile der Plattentests wie Verwendung verschiedener Substrate und Inkubationstemperaturen bzw. die Einstellung unterschiedlicher a_w - und pH – Werte. Außerdem reagiert dieser Test sehr sensitiv. Jedoch muss unbedingt die jeweilige Substratspezifität bzw. die entsprechenden Reaktionsbedingungen berücksichtigt werden. Nachteilig wirkt sich die lange Inkubationszeit aus. Weiterhin kann bei der Untersuchung bakterieller Lipaseaktivitäten nicht mit der Rohbouillon gearbeitet werden, sondern diese muss steril filtriert werden, um eine Kontamination der Agarplatten zu vermeiden. Dies kann jedoch unter Umständen zum Verlust von Lipasekonzentrationen führen, wie bereits diskutiert wurde.

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, den Anwendungsbereich des Reflectoquant® Lipase – Tests um 5 Applikationsvorschriften für die Messung bakterieller Lipasen und gewebeeigener Lipasen in Fleisch, Wursterzeugnissen, Leber und Fisch zu erweitern. Die Messungen erbrachten erste Hinweise zu natürlicherweise enthaltenen Lipasekonzentrationen in den untersuchten Geweben. Da hierbei z.T. bakterielle als auch gewebeeigene Lipasen erfasst werden, wurde nach einer Möglichkeit der Differenzierung gesucht. Aufgrund der deutlich niedrigeren Thermostabilität gewebeeigener Lipasen eignet sich dieses Kriterium zur Abgrenzung. Ein Nachweis von Lipasen in erhitzten Produkten könnte daher mikrobiellen Ursprungs sein und auf eine starke Kontamination der Ausgangsprodukte mit Bakterien bzw. mangelnde Erhitzung hindeuten. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass in lipase-reichen Geweben wie z.B. Leber, noch sehr geringe Lipasekonzentrationen nach Erhitzung auf 70 °C nachweisbar waren.

Der Reflectoquant® Lipase – Test ermöglicht es, neben der Gesamtkeimzahl als Parameter zur Einschätzung des Verderbs, auch die Konzentration von Lipasen als wichtigen Faktor im Verderbnisprozess mit einzubeziehen.

Kritisch anzumerken ist, dass mit dem Nachweis der Lipasen noch keine Aussagen darüber getroffen werden können, inwieweit diese den Verfall eines Lebensmittels hervorrufen bzw. beeinflussen können. Es scheint jedoch sinnvoll, durch weitere Untersuchungen (Lagerungsversuche) Informationen zu diesem Sachverhalt zu erarbeiten. Bekannt ist, dass es durch Unterschiede in der Aktivität der Muskel- und Phospholipasen zu einer unterschiedlichen Konzentration an Geschmacksvorläuferstufen und daraus resultierend zu Differenzen in der Aromaentwicklung kommt (HERNÁNDEZ et al. 2004).

6 Zusammenfassung

Susanne Büchner

Bestimmung mikrobieller und gewebeigener Lipasen mit dem Reflectoquant® Lipase-Test (Merck KGaA)

Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Februar 2007

110 Seiten, 14 Abbildungen, 33 Tabellen, 231 Literaturangaben, 8 Tabellen im Anhang

Schlüsselwörter: Gewebslipasen, bakterielle Lipasen, Thermostabilität, Lebensmittelverderb

Fetthaltige Lebensmittel tierischer Herkunft sind aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes besonders anfällig für Lipolyse. Ausschlaggebend hierfür ist die Wirkung mikrobieller und gewebeigener Lipasen. Für die Beurteilung der Haltbarkeit und Qualität derartiger Lebensmittel werden vorwiegend die sensorische Prüfung und mikrobiologische Untersuchungen eingesetzt. Eine Einschätzung lipolytischer Aktivitäten erfolgt derzeit nicht routinemäßig. Von Seiten der Lebensmittelindustrie und der Lebensmittelüberwachung besteht, besonders im Zusammenhang mit Qualitätssicherungssystemen, großes Interesse an einer schnellen Verfügbarkeit von Ergebnissen, um das Verderbnispotential der Lebensmittel effizienter abschätzen zu können.

Schwerpunkte dieser Arbeit bildeten daher:

- die Entwicklung von Applikationsvorschriften zur Bestimmung bakterieller und gewebeigener Lipasen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test, einem für Milchlipasen konzipierten Schnelltest der Fa. Merck,
- die Messung synthetisierter Lipasekonzentrationen ausgewählter Verderbniserreger (n= 168) bzw. gewebeigener Lipasen (n= 127) in Fleisch (Schwein, Rind, Hähnchen, Kaninchen), Fisch (Kabeljau, Forelle, Hering), Wurst- und Fischerzeugnissen sowie Leber (Schwein, Pute),
- die Erfassung von Konzentrationen nach 5-minütiger Erhitzung bei 50, 60, 70 und 80 °C, um eventuelle Unterschiede in der Thermoresistenz von bakteriellen und gewebeigenen Lipasen aufzuzeigen sowie
- der Vergleich der Substratverwertbarkeit verschiedener bakterieller Lipasen gegenüber Caprylat, Tributyrin und Tween 60.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Der Anwendungsbereich des Reflectoquant® Lipase – Tests konnte um 5 Applikationsvorschriften zur Messung bakterieller Lipasekonzentrationen in Nährbouillon und zur Messung gewebeigener Lipasekonzentrationen in den oben aufgeführten Produkten

erweitert werden. Dabei wurden Lösungsvorschläge zur Beseitigung von Störeinflüssen wie z.B. Ascorbinsäure in Wursterzeugnissen, erarbeitet.

- Unter Verwendung des Reflectoquant[®] Lipase – Tests konnte das lipolytische Synthesepotential von 56 Bakterienstämmen der Spezies *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *P. mirabilis* und *Ser. marcescens* nach Anzüchtung unter Optimalbedingungen bestimmt werden. Als besonders starke Lipasebildner mit Konzentrationen von > 50 µg/l, fielen Stämme von *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *A. hydrophila* und *S. aureus* auf.
- Für die Lebensmittel Fleisch, Fisch und Leber wurden erstmals Orientierungswerte zu natürlich enthaltenen Lipasekonzentrationen (gewebseigene Lipasen) ermittelt. Die Lipasekonzentrationen in Fleisch bewegten sich zwischen 44 µg/kg (Schwein) und 370 µg/kg (Kaninchen). In Fisch lagen sie zwischen 228 µg/kg (Kabeljau) und 1200 µg/kg (Forelle). Die höchsten Konzentrationen wurden in Schweineleber mit 122100 µg/kg gemessen.
- Die nach Erhitzung gemessenen Konzentrationen bestätigen, dass bakterielle Lipasen wesentlich hitzestabiler sind als gewebseigene. Besonders hitzestabile Lipasen mit Restaktivitäten zwischen 16 % und 31 % nach 5-minütiger Erhitzung bei 70 °C bildeten die Stämme *Ps. aeruginosa* 5x und 1, *Ps. fluorescens* 9 und *S. aureus* 4.
- Die geringe Hitzestabilität der gewebseigenen Lipasen (keine Restaktivitäten in Fisch, Rind-, Schweine- und Geflügelfleisch nach 5 min bei 70 °C) ist die Ursache für den fehlenden Lipasenachweis in den geprüften Brüh- und Kochwürsten (z.B. Bierschinken). Aufgrund dieser Unterschiede ist eine Abgrenzung bakterieller von gewebseigenen Lipasen möglich. Nachgewiesene Lipasekonzentrationen in erhitzten Produkten könnten daher ein Hinweis auf einen hohen Ausgangskeimgehalt mit Lipasesynthese und/oder mangelnde Erhitzung sein. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass in lipasereichen Geweben, z.B. Leber, noch sehr geringe Lipasekonzentrationen nach Erhitzung auf 70 °C nachweisbar waren.
- Von den drei Substraten wurden besonders gut Tributyrin und Caprylat von den getesteten bakteriellen Lipasen hydrolysiert. Die Prüfung der Substratverwertbarkeit hat insbesondere Bedeutung für die Einschätzung der Wirkung von Lipasen und die Voraussage der Haltbarkeit fetthaltiger Lebensmittel.

Mit der nunmehr breiteren Anwendung des Reflectoquant[®] Lipase – Tests und den neugewonnenen Kenntnissen über Lipasekonzentrationen in Lebensmitteln könnte möglicherweise, unter Einbeziehung der Gesamtkeimzahlbestimmung und sensorischen Eindrücken, die Einschätzung des Verderbs bzw. der Haltbarkeit präzisiert werden. Welche konkreten Lipasekonzentrationen lebensmittelhygienisch in Bezug auf Haltbarkeit und Qualität relevant sind, muss für die einzelnen Lebensmittel in Lagerungsversuchen und begleitenden mikrobiologischen Untersuchungen noch geprüft werden.

7 Summary

Susanne Büchner

Determination of bacterial and tissue lipases using the Reflectoquant® Lipase– Test (Merck KGaA)

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in February 2007

110 pages, 14 figures, 33 tables, 231 references, 8 tables in the appendix

Keywords: tissue lipases, bacterial lipases, heat stability, food spoilage

The activity of lipases is one of the main causes for spoilage and product deteriorations of fat containing food. Little is known about the concentration of tissue lipases in meat and fish.

There exist two established methods to estimate the shelf life and quality at the moment: the determination of the total viable count and the sensoric assessment. These procedures, however, do not consider the effects of enzymes.

The food industry and food safety inspectors are especially interested in rapid methods and a fast availability of those results for a better evaluation of the spoilage potential in foods of animal origin.

The emphasis of this work was placed on:

- the development of applications for detection of bacterial and tissue lipase concentrations with a new rapid test: Reflectoquant® Lipase – Test (Merck), originally developed for milk lipases,
- the detection of synthesized lipases by selected spoilage organisms (n= 168) and concentrations of tissue lipases (n= 127) in meat (pork, beef, chicken, rabbit), meat products, fish (cod, rainbow trout, herring), fish-products and liver (pork, turkey),
- the evaluation of the heat stability of bacterial and tissue lipases after heating on 50, 60, 70 and 80 °C for 5 min and record differences between bacterial and tissue lipases,
- to compare the ability of selected microbial lipases to hydrolyse substrates such as caprylate, tributyrin and tween 60.

The following results were achieved:

- Five new applications for measuring bacterial and tissue lipases with Reflectoquant® Lipase – Test (Merck) in nutrient broth, meat, meat products and liver were developed. The investigations include advices for elimination of sources of irritations like ascorbic acids in meat products. Results are available in one hour.
- The lipase synthesis of 56 strains of the following species: *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *P. mirabilis*

and *Ser. marcescens* were measured with Reflectoquant[®] Lipase – Test (Merck) after incubation at optimal conditions. High lipase concentration (> 50 µg/l) could be observed for the strains of *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *A. hydrophila* and *S. aureus*.

- For the first time quantitative data are available for tissue lipase concentrations in meat, fish and liver. Lipase concentrations in meat ranged between 44 µg/kg (pork meat) and 370 µg/kg (rabbit meat). The highest concentration was observed in rainbow trout with 1200 µg/kg and in porcine liver with 122100 µg/kg.
- The heat stability of bacterial lipases is much higher than the stability of tissue lipases. Especially lipases of *Ps. aeruginosa* 5x and 1, *Ps. fluorescens* 9 and *S. aureus* 4 showed a high thermo resistance with residual activities between 16 and 31 % after heating at 70 °C for 5 min.
- The low heat stability of tissue lipases (no residual activities in fish, beef, pork and chicken after heating at 70 °C for 5 min) is the reason for absent lipase concentration in the tested products like Bierschinken etc. Therefore, a differentiation is possible between microbial and tissue lipases. Lipases in heated products could be a sign for high viable counts with lipase synthesis and/or ineffective heating. It must be considered that tissues with very high concentrations such as liver, showed very low rest activities after heating on 70 °C.
- Tributyrin and caprylate were better hydrolysed by bacterial lipases than tween 60, which is important for the evaluation of the shelf life of fat containing products.

With the new applications for Reflectoquant[®] Lipase – Test (Merck) it is possible to estimate microbial and tissue lipases in food of animal origin and broth.

In further studies should be tested, whether a specific concentration of lipases can be linked to the onset of product deterioration.

8 Literaturverzeichnis

- Abad P, Villafafila A, Frias JD, Rodriguez-Fernandez C. Extracellular lipolytic activity from *Pseudomonas fluorescens* biovar I (*Pseudomonas fluorescens* NC1). *Milchwiss.* 1993; 48:680-3.
- Abdou AM. Purification and partial characterisation of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *J Dairy Sci.* 2003; 86(1):127–32.
- Adams DM, Brawley TG. Heat resistant bacterial lipases and ultra-high temperature sterilization of dairy products. *J Dairy Sci.* 1981 b; 64:1951-7.
- Alasnier C, Meynier A, Viau M, Gandemer G. Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage. *J Food Sci.* 2000 b; 65 (1):9-14.
- Alasnier C, David-Briand E, Gandemer G. Lipolysis in muscles during refrigerated storage as related to the metabolic type of the fibres in the rabbit. *Meat Sci.* 2000 a; 54:127-34.
- Al-Shabibi MMA, Langner EH, Tobias J, Tuckey L. Effect of added fatty acids on the flavour of milk. *J Dairy Sci.* 1962; 69:295-6.
- Ameis D, Merkel M, Eckerskorn C, Greten H. Purification, characterisation and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. *Eur J Biochem.* 1994; 219:905-14.
- Andersson RE. Microbial lipolysis at low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 1980; 39(1): 36-40.
- Andersson RE, Hedlund CB, Jonsson U. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J Dairy Sci.* 1979; 62:361-7.
- Andrews AT, Anderson M, Goodenough PW. A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes. *J Dairy Res.* 1987; 54:237-46.
- Anonymus. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, 06.00 – 18. Berlin, Wien, Zürich: Beuth – Verlag GmbH; 1984.
- Anonymus. Leitsätze für Speisefette und Speiseöle. In: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Deutsches Lebensmittelbuch. Köln: Bundesanzeiger Verlag; 2003.
- Anonymus. Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vom 01. 09. 2005. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2005, Teil I, Nr. 55 (06.09.2005).

- Anonymus. Fleisch – Einkaufstipps. 2007 (zitiert vom 02.01.2007): 1, <<http://www.cma.de/content/magazin/einkaufstipps.php>>.
- Antequera T, Garcia C, López C, Ventanas J, Asensio MA, Córdoba JJ. Evolution of different physico-chemical parameters during ripening Iberian ham from Iberian (100%) and Iberian x Duroc pigs (50%). *Revista de Agroquímica y tecnología de los alimentos*. 1994; 34:178-90.
- Arpigny JL, Jaeger K-E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J*. 1999; 343:177-83.
- Babin PJ, Vernier J-M. Plasma lipoproteins in fish. *J Lipid Res*. 1989; 30(4):467-89.
- Bariszlovich M, Meusel D, Tülsner M. Die Charakterisierung mikrobieller Lipasen. 1. Mitt. Zur Bestimmung der Lipaseaktivität. *Nahrung*. 1990; 34:701-17.
- Baumgart J. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 4. Auflage, Hamburg: Behr's Verlag, 1999.
- Becker B, Trierweiler B, Fechner J, Böhme T, Spieß W E L, Holzapfel W H. Bedienungskühltheben im Einzelhandel. 2. Mikrobiologisch-hygienische Qualität von Brühwurstproben. *Fleischwirtsch*. 2002; 1:84–6.
- Beisson F, Tiss A, Rivière C, Verger R. Methods for Lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2000; 102(2):133-53.
- Bem Z, Hechelmann H. Kühlung und Kühlagerung von Fleisch. Mikrobiologische Vorgänge. *Fleischwirtsch*. 1994; 74(9):916-24.
- Bem Z, Hechelmann H. Kühlung und Kühlagerung von Fleisch. Mikrobiologische Vorgänge. *Fleischwirtsch*. 1994; 74(10):1046-51.
- Benedetti S, Pompei C, Mannino S. Comparison of an electronic nose with the sensory evaluation of food products by „Triangle Test“. *Electroanalysis*. 2004; 16(21):1801-5.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 nd ed. Baltimore, London: Williams and Wilkins; 1986.
- Biebler K-E, Jäger B, Bibby J. Einige Anregungen zur statistischen Bearbeitung von Beobachtungsmaterial geringen Umfangs. *Z ärztl Fortbild*. 1984; 78:243-7.
- Blixt Y, Borch E. Using of electronic nose for determining the spoilage of vacuum-packaged beef. *Int J Food Microbiol*. 1999; 46:123-34.
- Bloquel R. Some properties of extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* 1B10. *Microbios Letters*. 1989; 41:7-15.

- Booth IR. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol.* 2002; 78(1-2):19-30.
- Boothe DDH, Arnold JW. Electronic nose analysis of volatile compounds from poultry meat samples, fresh and after refrigerated storage. *J Sci Food Agric.* 2002; 82(3):315-22.
- Borriß R. Zelldifferenzierung und Bildung extrazellulärer Enzyme. In: Hecker M, Babel W, Hrsg. *Physiologie der Mikroorganismen.* Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 1988.
- Bosund I, Garnot E. Effect of pre-cooking of baltic herring on lipid hydrolysis during subsequent cold storage. *Lebensm Wiss Technol.* 1969 a; 2:59-61.
- Bosund I, Garnot E. Lipid hydrolysis in frozen baltic herring. *J Food Sci.* 1969 b; 34:13-8.
- Boyer P, editor. *The Enzymes.* Vol XVI. 3th ed. New York: Academic Press; 1983.
- Brand E, Liaudat M, Olt R, Linxweiler W. Rapid determination of lipase in raw, pasteurised and UHT – milk. *Milchwiss.* 2000; 55(10): 573-76.
- Braun P. Untersuchungen zur Hitzestabilität bakterieller Proteasen und Lipasen. II. Mitteilung: Lipasen. *Arch Lebensmhyg.* 1999; 50:9-13.
- Braun P, Fehlhaber K. Quantitative Vorkommen von Lipolyten und Proteolyten in Lebensmitteln tierischer Herkunft. *Dtsch Tierärztl Wschr.* 2001; 108:371-5.
- Braun P, Fehlhaber K. Combined effect of temperature, a_w , and pH on enzymatic activity of spoilage - causing bacteria. *Milchwiss.* 2002; 57:134-6.
- Braun P. Untersuchungen des Fett- und Eiweißabbaus durch spezifische Verderbnisorganismen – ein Beitrag zur Etablierung einer wissenschaftlich fundierten Haltbarkeitsvoraussage für Lebensmittel [Habilschrift med. vet.]. Leipzig: Universität Leipzig; 2003.
- Braun P. Verderb von Lebensmitteln. In: Fehlhaber K, Kleer J und Kley F, editors. *Handbuch Lebensmittelhygiene. Praxisleitfaden mit wissenschaftlichen Grundlagen.* Hamburg: Behr's Verlag, 2005.
- Bredholt S, Haugen JE. Use of gas sensor array technology for detection and growth monitoring of spoilage bacteria in milk. *Proceedings of the 18th International Symposium of the ICFMH, Food Micro;* 2002 Aug 17-23; Lillehammer; p. 256.
- Brune AK, Götz F. Degradation of lipids by bacterial lipases. In: Winkelmann G. Ed. *Microbial degradation of natural products.* Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH, 1992. p. 243-63.

- Bucky AR, Hayes PR, Robinson DS. Lipase production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in whole milk and skimmed milk. Food Microbiol. 1986; 3:37-44.
- Bucky AR, Robinson DS, Hayes PR. Factors effecting the heat stability of lipase produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. Food Chem. 1987 a; 23(3):159–73.
- Bucky AR, Robinson DS, Hayes PR. Enhanced deactivation of of bacterial lipases by modified UHT treatment. J Food Sci Technol. 1987 b; 22:35-40.
- Cannon JE, Morgan JB, Schmidt GR, Tatum JD, Sofos JN, Smith GC et al. Growth and fresh meat quality characteristics of pigs supplemented with vitamin E. J Anim Sci. 1996; 74:98-105.
- Cava R, Ferrer JM, Estévez M, Morcuende D, Toldra F. Composition and proteolytic and lipolytic enzyme activities in muscle Longissimus dorsi from Iberian pigs and industrial genotype pigs. Food Chem. 2004; 88(1):25-33.
- Chandran SK, Savell JW, Griffin DB, Vanderzant C. Effect of slaughter-dressing, fabrication and storage conditions on the microbiological and sensory characteristics of vacuum-packaged beef steaks. J Food Sci. 1986; 51(1):37-9.
- Cheng C, Bensadoun A, Bersot T, Hsu JST, Melford KH. Purification and characterisation of human lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase. J Biol Chem. 1985; 260(19): 10720-27.
- Claeys E, de Smet S, Demeyer D, Geers R, Buys N. Effect of rate of pH decline on muscle enzyme activities in two pig lines. Meat Sci. 2001; 57:257-63.
- Collins MD, Rodrigues UM, Dainty RH, Edwards RA, Roberts TA. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum - packed beef: Description of *Clostridium estertheticum*. FEMS Microbiol Lett. 1992; 96:235-40.
- Coutron-Gambotti C, Gandemer G. Lipolysis and oxidation in subcutaneous adipose tissue during dry-cured ham processing. Food Chem. 1999; 64:95-101
- Cryer A, Kirtland J, Jones HM, Gurr MI. Lipoprotein lipase activity in the tissues of guinea pigs exposed to different dietary fats from conception to three months of age. Biochem J. 1978; 170:169-72.
- Currie RW, Wolfe FH. Evidence for differences in post-mortem intramuscular phospholipase activity in several muscle types. Meat Sci. 1977; 1(3):185-93.
- Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK et al. Relationship between sequence conservation and three - dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. Protein Sci. 1993; 2:366-82.

- Dainty RH, Edwards RA, Hibbard CM, Marnewick JJ. Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures. J Appl Bacteriol. 1989; 66(4):281-9.
- Dainty RH. Chemical/biochemical detection of spoilage. Intern J Food Microbiol. 1996; 33:19-33.
- De Pablo B, Asensio MA, Sanz B, OrdonezJA. The D(-) lactic acid and acetoin/diacetyl as potential indicators of the microbial quality of vacuum-packed pork and meat products. J Appl Bacteriol. 1989; 66:185-90.
- Dieckelmann M, Johnson LA, Beacham IR. The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. J Appl Microbiol. 1998; 85:527–36.
- Driessen FM, Stadhouders J. Thermal activation and inactivation of exocellular lipase of some gram - negative bacteria common in milk. Neth Milk Dairy J. 1974 a; 28:10-13.
- Dring R, Fox PF. Purification and characterization of a heat-stable lipase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 29. Irish J Food Sci Technol. 1983; 7:157-71.
- Eikelenboom G, Hoving-Bolink AH, van der Wal PG. Die Verzehrsqualität von Schweinefleisch. 2. Einfluß des intramuskulären Fettes. Fleischwirtsch. 1996; 76(5):559-60.
- Ellis DI, Broadhurst D, Kell DB, Rowland and Goodacre R. Rapid detection method for microbial spoilage using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and machine learning. Abstracts of 157 th Meeting of Society for General Microbiology; 2005 Sep 12-14; Keele University.
- Eggert T, Pencreach G, Douchet I, Verger R, Jäger K-E. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. Eur J Biochem. 2000; 267(21):6459-69.
- Fehlhaber K, Scheibner G. Mikrobielle Enzyme aus der Sicht der veterinärmedizinischen Lebensmittelhygiene. Monatsh Vet Med. 1974; 29:307-13.
- Fehlhaber K, Janetschke P. Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene. Jena, Stuttgart: Fischer-Verlag; 1992.
- Fielding BA, Frayn KN. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. Review. Brit J Nutr. 1998; 80: 495-502.
- Finkelstein A, Strawich E, Sonnino S. Characterisation and partial purification of a lipase of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta. 1970; 206:380-5.

- Fischer K. Fleischfehler müssen nicht sein. 2. Untypische Qualitätsabweichungen, intramuskuläres Fett und Fettsäurezusammensetzung. Fleischwirtsch. 2001; 11:16-21.
- Fischer K, Kratz R. Sensorische Qualität von mit Polyensäuren angereichertem Schweinefleisch. Jahresbericht BAFF Kulmbach 1999, p. 13-15.
- Fitzgerald CH, Deeth HC. Factors influencing lipolysis by skim milk cultures of some psychotrophic microorganisms. Australian J Dairy Technol. 1983; 38:97-103.
- Foissy H. Milchtechnologie – Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Wien: IMB Verlag; 2005.
- Fox PF, Stepaniak L. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. J Dairy Res. 1983; 50:77-80.
- Franzke C. Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 3. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag; 1996.
- Gallo L, Schmitt RE, Schmidt-Lorenz W. Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. I. Bacterial flora and growth during storage. Lebensm Wiss u Technol. 1988; 21:216–23.
- Garcia ML, Sanz B, Garcia-Colia P, Ordonez JA. Activity and thermostability of the extracellular lipases and proteases from pseudomonads isolated from raw milk. Milchwiss. 1989; 44:547-50.
- Geromel EJ, Montgomery MW. Lipase release from lysosomes of rainbow trout muscle subjected to low temperature. J Food Sci. 1980; 45:412-15.
- Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP, Davidson S. Microbial lipases: production and applications. Sci Prog. 1996; 79(2):119-57.
- Giacconne V, Civera T, Parisi E. Vacuum packaging of bovine tripe. Microbial contamination and indole content. Sci Aliments. 1994; 14:801-9.
- Gilbert EJ, Cornish A, Jones CW. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J Gen Microbiol. 1991 a; 137:2223-9.
- Gilbert EJ, Drozd JW, Jones CW. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF 2. J Gen Microbiol. 1991 b; 137:2215–21.
- Gill CO. Microbial interaction with meats. In: Brown MH, Ed. Meat Microbiology. London: Applied Science Publishers Ltd.; 1982. p. 225–64.
- Götz F, Verheij HM, Rosenstein R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion and processing. Chem Phys Lipids. 1998; 93: 15-25.

- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. Food Spoilage – Interaction between food spoilage bacteria. Intern J Food Microbiol. 2002; 78:79-97.
- Griffiths MW, Phillips JD, Muir DD. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. J Appl Bacteriol. 1981; 50:289–303.
- Grün E. Physiologische und diagnostische Bedeutung von Enzymen in der Kuhmilch, Band 23, Heft 7. Berlin: Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR; 1985.
- Gupta R, Rath P, Gupta N, Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnol Appl Biochem. 2003; 37:63-71.
- Halpin-Dohnalek MI, Marth EH. *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods - A review. J Food Prot. 1989; 52:267-82.
- Hardy R, McGill AS, Gunstone FD. Lipid and autoxidative changes in cold stored cod (*Gadus morhua*). J Sci Food Agric. 1979; 30:999-1006.
- Hartmann St, Otten W, Kratzmair M, Seewald MJ, Iazzo PA, Eichinger HM. Influences of breed, sex, and susceptibility to malignant hyperthermia on lipid composition of skeletal muscle and adipose tissue in swine. Am J Vet Res. 1997; 58:738-43.
- Haslbeck F, Senser F, Grosch W. Nachweis niedriger Lipase-Aktivitäten in Lebensmitteln. Z Lebensm Unters Forsch. 1985; 181:271-75.
- Haugen JE, Nilsen AC, Nissen H. Determination of shelf-life of brine- and dry- salted salmon by gas sensor array (electronic nose) and microbial analysis. Proceedings of the 18th International Symposium of the ICFMH, Food Micro; 2002 Aug 17-23; Lillehammer; p. 259.
- Hauke H. Die Mikrobiologie der Milch und Milchprodukte. In: Schönherr W, Hrsg. Tierärztliche Milchhygiene. Leipzig: Hirzel Verlag; 1967.
- Hayes PR. Food microbiology and hygiene. London: Elsevier; 1985. p. 80-139.
- Hechelmann, H. Mikrobiell verursachte Fehlfabrikate bei Rohwurst und Rohschinken. Fleischwirtsch. 1986; 66(4):515–28.
- Hechelmann H, Kasproviak R. Mikrobiologische Kriterien für stabile Produkte. Fleischwirtsch. 1991; 71(4):374-89.
- Hernández P, Navarro J-L, Toldra F. Lipid composition and lipolytic enzyme activities in porcine skeletal muscles with different oxidative pattern. Meat Sci. 1998; 49:1-10.

- Hernández P, Zomeño L, Ariño B, Blasco A. Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Sci.* 2004; 66:525-29.
- Herzog R. Fleischerzeugung mit Gehegewild und Kaninchen. *Fleischwirtsch.* 1994; 74(2):150-53.
- Heeschen W. Vermehrung von Mikroorganismen in Lebensmitteln. In: Fehlhaber K, Kleer J und Kley F, Hrsg. *Handbuch Lebensmittelhygiene. Praxisleitfaden mit wissenschaftlichen Grundlagen.* Hamburg: Behr's Verlag, 2005.
- Hinrichsen LL, Montel MC, Talon R. Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus* (65), *Halomonas elongata* (16) and *Vibrio sp.* (168) isolated from danish bacon curing brines. *Int J Food Microbiol.* 1994; 22:115-26.
- Homes B, Gross RJ. Coliform bacteria. In: Parker MT, Duerden BI, editors. *Topley and Wilsons Principles of Bacteriology, Virology and Immunology.* Vol 8. London: Edwards and Arnolds; 1990.
- Honikel KO, Wellhäuser R. Zusammensetzung verbrauchergerecht zugeschnittener Schweinefleischstücke. *Fleischwirtsch.* 1993 a; 73(8):863-6.
- Honikel KO, Wellhäuser R. Zusammensetzung verbrauchergerecht zugeschnittener Rindfleischstücke. *Fleischwirtsch.* 1993 b; 73(9):1051-6.
- Honikel KO, Klötzer E. Zusammensetzung von Brathähnchen und Hähnchenteilstücken. *Fleischwirtsch.* 1996; 76(1):83-7.
- Huis in't Veld JHJ. Microbial und biochemical spoilage of foods: An overview. *Int J Food Microbiol.* 1996; 33:1-18.
- Huss HH. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical papers – T 349.* Rom; 1995.
- Iizumi T, Nakamura K, Fukase T. Purification and characterisation of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas sp.* KWI-56. *Agric Biol Chem* 1990; 54:1253-8.
- Jahan K, Paterson A, Spickett C M. Fatty acid composition, antioxidants and lipid oxidation in chicken breasts from different production regimes. *Int J Food Sci Technol.* 2004; 39(4):443-53.
- Kalogridou – Vassiliadou D. Lipolytic activity and heat resistance of extracellular lipases of some gram-negative bacteria. *Milchwiss.* 1984; 39(10):601–3.
- Kalogridou-Vassiliadou D. Biochemical activities of bacillus species isolated from flat sour evaporated milk. *J Dairy Sci.* 1992; 75(10):2681-6.

- Kampen MD, Dekker N, Egmond MR, Verheij HM. Substrat specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase and *Staphylococcus aureus* lipase as studied by in vivo chimeragenesis. *Biochemistry*. 1998; 37:3459–66.
- Karnetová J, Mateja J, Rezanka T, Procházka P, Nohýnek M, Rokos J. Estimation of lipase activity by the diffusion plate method. *Folia Microbiol*. 1984; 29:346-7.
- Kim HK, Sung MH, Kim HM, Oh TK. Occurence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1994; 58:961-2.
- Kirov SM, Ardestani EK, Hayward LJ. The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperatur by *Aeromonas* strains isolated from foods. *Int J Food Microbiol*.1993;200:159-168.
- Kirst E, Mayer A, Cerna E, Obermaier O. Beeinflussung der sensorischen Qualität der Milch durch lipolytische Veränderungen. *Milchforschung-Milchpraxis*. 1983; 25:100-102.
- Klettner P-G. Kühlen und Gefrieren von Schlachttierkörpern. *Fleischwirtsch*. 1996; 7:679–87.
- Klug C. Untersuchungen zum kombinierten Einfluß von Temperatur, a_w – und pH – Wert sowie verschiedenen Erhitzungsregimes auf die Aktivität von extrazellulären Proteasen ausgewählter Bakterienspezies [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Universität Leipzig; 1997.
- Kolb E, Wahren M, Dobeleit G, Gründel G. Untersuchungen über den Gehalt an Ascorbinsäure in verschiedenen Geweben von Rindern, normal entwickelten Ferkeln, Grätschferkeln, adulten Schweinen sowie von Hunden. *Arch Exp Vet Med*. 1989; 43:327 – 34.
- Kopp K. Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Temperaturen, pH – Werte und a_w – Werte auf die Aktivität extrazellulärer mikrobieller Lipasen [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Universität Leipzig; 1997.
- Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterisation, crystallization, and preliminary x-ray diffraction data. *J Bact*. 1991; 173(15):4836-41.
- Kouker G, Jäger K-E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol*. 1987; 53:211-3.
- Kreyenschmidt J, Peters N, Petersen B, Kunz B. Weiterentwicklung von Methoden zur Überprüfung der Einhaltung der Kühlkette bei frischen Lebensmitteln. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn. Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 107; 2003.

- Kroll J. Lipasen. In: H Ruttloff, Hrsg. Industrielle Enzyme. Hamburg: Behr's Verlag; 1994.
- Kumura H, Mikawa K, Saito Z. Purification and characterization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. *Milchwiss.* 1993; 48:431-4.
- Kunath H. Mikrobiologie der Milch. Leipzig: VEB Fachbuchverlag; 1981.
- Kunz B. Grundriß der Lebensmittelmikrobiologie. Hamburg: Behr's Verlag; 1994.
- Lanari MC, Schaefer DM, Scheller KK. Dietary vitamin E supplementation and discoloration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. *Meat Sci.* 1995; 41:237-50.
- Law BA, Sharpe ME, Chapman HR. The effect of lipolytic gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *J Dairy Res.* 1976; 43:459–68.
- Law BA. Reviews of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J Dairy Res.* 1979; 46:573-88.
- Lawson P, Dainty R H, Kristiansen N K, Berg J S, Collins M D. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum – packed cooked pork: Description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. *Lett Appl Microbiol.* 1994; 19:153-7.
- Lebert I, Begot C, Lebert A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5,8 – 7,0), water activity (0,97 – 1,00) and temperature (7 – 25 °C). *Int J Food Microbiol.* 1998; 39:53–60.
- Lesuisse E, Schanck K, Colson C. Purification and preliminary characterisation of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem.* 1993; 216:155-160.
- Leupold G. Lebensmittelhygienische Untersuchungen an Regenbogenforellen nach Anwendung verschiedener Betäubungsverfahren. [Dissertation med. vet]. Leipzig: Universität Leipzig; 1997.
- Liston J. Microbiology in fishery science. In: Connel JJ, editor. *Advances in fish science and technology*. Farnham, Surrey (England): Fishing News Books Ltd.; 1980. p. 138-57.
- Löffler G, Weiss L. Bioenergetik und Enzymologie. In: Löffler G, Petrides P E: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6 Auflage. Berlin: Springer; 1998. p. 84-105.
- Lund B M, Baird – Parker A C, Gould G W. The microbiological safety and quality of foods. Inc Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers (USA); 2000.

- Marangoni AG. Candida and *Pseudomonas* lipase-catalyzed hydrolysis of butteroil in the absence of organic solvents. J Food Sci. 1994; 59:1096-9.
- Marsili RT. Shelf-life prediction of processed milk by solid-phase microextraction, mass spectrometrie, and multivariate analysis. J Agric Food Chem. 2000; 8:3470-5.
- Matsumae H, Shibatani T. Purification and characterisation of the lipase from *Serratia marcescens* SR 41-8000 responsible for asymmetrie hydrolysis of 3-phenylglycidic acid. J Ferment Bioeng. 1994; 77:152-158.
- Mayr D, Margesin R, Klingsbichel E, Hartungen E, Jenewein D, Schinner F et al. Rapid detection of meat spoilage by measuring volatile organic compounds by using proton transfer reaction mass spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(8):4697-705.
- Mc Kellar RC, Cholette H. Determination of the extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* spp. in skim milk with the β -naphthyl caprylate assay. J Dairy Res. 1986; 53:301-12.
- Mersmann HJ. Lipoprotein and hormon-sensitive lipases in porcine adipose tissue. J Anim Sci. 1998; 76:1396-1404.
- Meyer HJ. Lipase und Antilipasestudien mit Vertretern der Genera *Serratia*, *Aeromonas* und *Vibrio* [Dissertation med.]. Hamburg: Universität Fachbereich Medizin; 1978.
- Misset O, Gerritse G, Jaeger K-E, Winkler U, Colson Ch, Schanck K et al. The structure-function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. Protein Eng. 1994; 7(4):523-9.
- Molly K, Demeyer D, Johansson G, Raemaekers M, Ghistelinck M, Geenen I. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. Food Chem. 1997; 59:539–45.
- Montel MC, Masson F, Talon R. Bacterial role in flavour development. Meat Sci. 1998; 49:111-23.
- Morgan CA, Noble RC, Cocchi M, Mc Cartney R. Manipulation of the fatty acid composition of pig meat lipids by dietary means. J Sci Food Agric. 1992; 58:357-68.
- Mossel DAA, Corry JEL, Struijk CB. Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1995.
- Motilva MJ, Toldra F, Flores J. Assay of lipase and esterase activities in fresh pork meat and dry-cured ham. Z Lebensm Unters Forsch. 1992; 195:446-50.
- Mottar J. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. Milchwiss 1981; 36:87-91.

- Münnich K, Haasmann St. Lipase in Milch – Vergleich zweier Verfahren zur Bestimmung von Lipasen in Milch. DMZ. 1999; 11:490-3.
- Muraoka T, Ando T, Okuda H. Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. J Biochem. 1982; 92(6):1933-9.
- Nikkola T, Alakomi H-L, Ritvanen T, Skyttä E, Smolander M, Ahvenainen R. Application of electronic nose for validating the quality of MA packed poultry meat. Proceedings of the 18th International Symposium of the ICFMH, Food Micro; 2002 Aug 17-23; Lillehammer; p. 254.
- Neumeyer K, Ross T, Mc Meekin TA. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. Int J Food Microbiol. 1997; 38:45–54.
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM et al. The alpha/beta hydrolase fold. Protein Eng. 1992; 5:197-211.
- Omar IC, Nishio N, Nahai S. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitolcorn steep liquor medium. Agric Biol Chem. 1987 (a); 51:2145-51.
- Ordonez JA, de Pablo B, Perez de Castro B, Asensio MA, Sanz B. Selected chemical and microbiological change in refrigerated pork stored in carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres. J Agric Food Chem. 1991; 39:668-72.
- Osterlund T. Struktur-function relationships of hormone-sensitive lipase. Eur J Biochem. 2001; 268(7):1899-1907.
- Ostermeyer U. Vitamine in Fischen. Ernährungs-Umschau. 2001; 48 (3):102-8.
- Palmeros B, Güereca L, Alagon A, Soberon-Chavez G. Biochemical characterization of the lipolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83. Proc Biochem. 1994; 29:207-12.
- Palumbo SA, Williams AC, Buchanan RL, Phillips JG. Model for the aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. J Food Prot. 1991; 54(6):429-35.
- Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. Review: The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem. 1999; 29:119-31.
- Pereira-Meirelles F V, Rocha-Leao, Sant'Anna Jr G L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. Biotechnol Lett. 2000; 22(1):71-75.
- Peters G, Pulverer G. Die Familie der Micrococcaceae. In: Brandis H, Pulverer G, Hrsg. Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 1988.

- Pichhardt K. Lebensmittelmikrobiologie. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1993.
- Polak T, Gašperlin L, Rajar A, Žlender B. Influence of genotype lines, age at slaughter and sexes on the composition of rabbit meat. Food Technol Biotechnol. 2006; 44:64-73.
- Prändl O, Fischer A, Schmidhofer T, Sinell HJ, Hrsg. Fleisch. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag & Co; 1988.
- Rawyler A, Siegenthaler PA. A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates. Biochim Biophys Acta. 1989; 1004(3):337-44.
- Reichstein K, Priebe K. Über die Produktion von Gefrierfisch. Arch Lebensm hyg. 1968; 19:244-9.
- Remer H, Jily R, Bauer F. Fütterung und technologische Wertigkeit von Fleisch. In: Paulsen P, Hrsg. Einflüsse auf die Fettqualität bei Lebensmitteln tierischer Herkunft. Wien : Sekt. Lebensmittel Tierischer Herkunft in der ÖGT; 2000.
- Renneberg R, Ruttloff H. Enzymaktivität. In: Ruttloff H, Hrsg. Industrielle Enzyme. Hamburg: Behr's Verlag; 1994.
- Renshaw EC, Sou Clemente CL. Lipase of *Staphylococcus aureus*: Its purification and characterisation. Development in Industrial Microbiol. 1967; 8:214-26.
- Reuter G. Untersuchung zur Mikroflora von vorverpackten, aufgeschnittenen Brüh- und Kochwürsten. Arch Lebensm hyg. 1970; 21(12):257-64.
- Rezanka T. Overproduction of microbial lipids and lipases. Folia Microbiologica. 1991; 36(3):211-24.
- Ristic M. Lagerung und Lagerungsveränderungen von Geflügel. Fleischwirtsch. 1980; 60:1607-22.
- Ristic M. Abhängigkeit der Fleischqualität von Lagerungstemperatur und – dauer bei Puten. Fleischwirtsch. 1980; 60:1894-95.
- Roderiguez-Fernandez C, Berasategui J, Villafafila A. Aktivität extrazellulärer Lipase von *Pseudomonas fluorescens* in Rohmilch. Milchwiss. 1992; 47(2):91-93.
- Rosenbauer H. Untersuchungen zur Ermittlung des Einflusses unterschiedlicher Dosierungen von DL-a-Tocopherylacetat beim Mastschwein auf die Qualität daraus gewonnener Lebensmittel [Dissertation agr.]. Halle – Wittenberg: Martin Luther-Universität; 2002.

- Roussis IG, Karabalis I, Papadopoulou C, Drinas C. Some properties of extracellular lipase from a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Lebensm Wiss Technol.* 1988; 21:188-94.
- Ruzin A, Novick RP. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000; 182(9):2668-71.
- Samad MYA, Razak CAN, Salleh AB, Yunus WMZW, Ampon K, Basri M. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J Microbiol Meth.* 1989; 9(1):51-6.
- Samelis J. Managing microbial spoilage in the meat industry. In: Blackburn C, editor. *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton, Boston, New York, Washington DC: CRC Press; 2006.
- Santos JA, López-Díaz T, García-Fernández M-C, García-López M-L, Otero A. Effect of lactic starter culture on the growth and protease activity of *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Bact.* 1996; 80:13-18.
- Sarda L, Desnuelle P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim Biophys Acta.* 1958; 30:513-21.
- Scheibner G. Untersuchungen zur lipolytischen Aktivität lebensmittelhygienisch wichtiger Bakterienarten. *Mh Vet Med.* 1970 a; 25:624-29.
- Schleusener H, Sielaff H, Peters H. Zur Modellierung der thermischen Inaktivierung von Enzymen. *Lebensmittelindustrie.* 1982; 29:439-43.
- Schreiter M. Mikrobiologie des Fleisches und der Fleischprodukte. In: Zickrick K, Wegener K, Schreiter M, Münch H-D, Saupe C, Schiefer G, Hrsg. *Mikrobiologie tierischer Lebensmittel*. 2 Auflage. Leipzig: Fachbuchverlag; 1986.
- Schuep W, Keck E. Measurement of ascorbic acid and erythorbic acid in processed meat by HPLC. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1990; 191(4-5): 290-2.
- Scollan N. Strategies for optimising the fatty acid composition of beef. 2003 (zitiert vom 21.01.2007): 1-5, <<http://www.iger.bbsrc.ac.uk/Publications/Innovations/In2003/Ch7.pdf>>.
- Senior BW. Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *Proteus* species. *J Med Microbiol.* 1999; 48:623-8.
- Severina LO, Bashkatova NA. Lipases of gram-negative bacteria: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 1981; 17(2):181-96.
- Shabtai Y, Daya-Mishne N. Production, purification, and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58:174-80.

- Shah DB, Wilson JB. Egg yolk factor of *Staphylococcus aureus*: II. Characterisation of the lipase activity. *J Bacteriol.* 1965; 98:949-53.
- Shah NP. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwiss.* 1994; 49(8):432-7.
- Shewan JM, Murray CK. The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrophiles. In: Russel AD, Fuller R, editors. Cold tolerant microbes in spoilage and the environment. The Society for Applied Bacteriology. Technical Series No. 13. Reading (UK), London, New York: Academic Press; 1979. p.117-136.
- Shewfelt RL. Fish muscle lipolysis – A Review. *J Food Biochem.* 1981; 5:79-100.
- Simons J-WFA, Kampen van MD, Riel S, Götz F, Egmond MRE, Verheij HM. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*. Comparison of the substrat selectivity with those of other microbial lipases. *Eur J Biochem.* 1998; 253:675-83.
- Singh A, Srinivasan RA, Dudani AT. Studies on exocellular lipases of some of the lipolytic bacteria. *Milchwiss.* 1973; 28(3):164-6.
- Singh A, Srinivasan RA, Dudani AT. Activity of microbial lipases at low temperatures. *Indian J Dairy Sci.* 1976; 29:61-3.
- Singh BR, Singh Y, Tiwari AK. Characterisation of virulence factors of *Serratia* strains isolated from foods. *Int J Food Microbiol.* 1997; 34:259-66.
- Sipos G. Einfluss des Ausnehmens auf die sensorische und hygienische Beschaffenheit von eisgelagerten Zandern (*Sander lucioperca*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) [Dissertation rer. agr.]. Berlin: Humboldt-Universität; 2003.
- Sklan D, Tenne Z, Budowski P. Simultaneous lipolytic and oxidative changes in turkey meat stored at different temperatures. *J Sci Food Agric.* 1983; 35:93-9.
- Smeltzer MS, Hart ME, Iandolo JJ. Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58:2815-19.
- Smith LC, Pownall HJ. Lipoprotein lipase. In: Borgström B, Brockmann HL, editors. Lipases. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier; 1984. p. 263-93
- Smulders FJM, Laack R LJM van. Über die Qualität von Schweinefleisch. 1. Mikrobiologische Schwerpunkte. *Fleischwirtsch.* 1992; 72(6):875-80.
- Stahnke G. Hepatische Triglycerid Lipase: Isolierung des Enzyms, Klonierung und Sequenzierung der cDNS und Teilen der genomischen DNS sowie Nachweis der Expression in Leberzellen [Dissertation med.]. Heidelberg: Medizinische Gesamtfakultät; 1987.

- Stead D. A fluorimetric method for determination of *Pseudomonas fluorescens* AR 11 lipase in skim milk powder, whey powder and whey protein concentrate. J Dairy Res. 1984; 51:623-28.
- Stead D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. J Dairy Res. 1986; 53:481-505.
- Stead D. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. J Dairy Res. 1987; 54:535-43.
- Stenström I-M und Molin G. Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. J Appl Bacteriol. 1990; 68:601-18.
- Stepaniak L, Birkeland S-E, Sorhaug T, Vagias G. Isolation and partial characterization of heat stable proteinase, lipase and phospholipase C from *Pseudomonas fluorescens* P1. Milchwiss. 1987; 42:75-9.
- Stiebing A, Hegerding L. Tiefkühlkost. Fleischwirtsch. 2004; 6:34-8.
- Sugihara A, Tani T, Tominaga Y. Purification and characterisation of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. J Biochem. 1991; 109:211-16.
- Sugiura, M. Bacterial lipase. In: Borgström B, Brockmann HL, editors. Lipases. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier; 1984. p. 505-20.
- Suzuki T, Mushiga Y, Yamane T, Shimizu S. Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*. Appl Microbiol. 1988; 27:417-22.
- Sztajer H, Borkowski J, Sobiech K. Purification and some properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase. Biotechnol Appl Biochem. 1991; 13:65-71.
- Taipa MA, Aires-Barros MR, Cabral JMS. Purification of lipases. J Biotechn. 1992; 26:111-42.
- Talon R, Montel MC. Hydrolysis of esters by staphylococci. Inter J Food Microbiol. 1997; 36(2-3):207-14.
- Thiemig F, Buhr H und Wolf G. Charakterisierung der Haltbarkeit und des Verderbsverhaltens frischer Lebensmittel. Erste Ergebnisse zur Anwendung der Weibull-Hazard-Analyse. Fleischwirtsch. 1998; 78(2):152-4.
- Tillack J. Lagerfähigkeit von tiefgefrorenen Forellen und tiefgefrorenen Lachsscheiben. Arch Lebensm hyg. 1975; 26:69-73.
- Toldra F, Flores M, Aristoy MC. Enzyme generation in free amino acids and its nutritional significance in processed pork meat. In: Charalambous G, editor. Food flavours:

- Generation, analysis and process influence. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1995. pp. 1303-22.
- Toldra F, Flores M. The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. Crit Rev Food Sci Nutr. 1998; 38(4):331-52.
- Traub PC. Gensynthese, Expression und Refolding der Lipasen aus *Pseudomonas* species KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* [Dissertation rer. nat.]. Stuttgart: Universität Stuttgart; 2000.
- Tülsner M. Fischverarbeitung - Band 1. Rohstoffeigenschaften und Grundlagen der Verarbeitungsprozesse. Hamburg: Behr's Verlag; 1994.
- Venugopal RJ, Ingham SC, McCurdy AR. Identification of psychrotrophic *Micrococcaceae* spp. isolated from fresh beef stored under carbon dioxide or vacuum. Int J Food Microbiol. 1994; 23:167-78.
- Waltman II WD, Shotts EB und Hsu T. Enzymatic characterisation of *Aeromonas hydrophila* complex by the API ZYM system. J Clin Microbiol. 1982;16(4):692-6.
- Wirth F, Leistner L, Rödel W. Richtwerte der Fleischtechnologie. 2. Auflage. Frankfurt/Main: Deutscher Fachverlag; 1990.
- Yano Y, Kataho N, Watanabe M, Nakamura T. Changes in the concentration of biogenic amines and application of tyramine sensor during storage of beef. Food Chem. 1995; 54:155-9.
- Zechner R. Rapid and simple isolation procedure for lipoprotein lipase from human milk. Biochim Biophys Acta. 1990; 1044:20-5.
- Zickrick K. Mikrobiologie tierischer Lebensmittel. 2. Auflage. Leipzig: VEB Fachbuchverlag; 1986.

Zitierung von Internetseiten

- Anonymus. Fleisch – Einkaufstipps. 2007 (zitiert vom 02.01.2007): 1, <<http://www.cma.de/content/magazin/einkaufstipps.php>>.
- Scollan N. Strategies for optimising the fatty acid composition of beef. 2003 (zitiert vom 21.01.2007): 1-5, <<http://www.iger.bbsrc.ac.uk/Publications/Innovations/In2003/Ch7.pdf>>.

Anhang

Tabelle 1: Messwerte bakterieller Lipasekonzentrationen mit dem Reflectoquant® Lipase - Test

Bakterienspezies	Stamm	Lipasekonzentration in µg/l		
		1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	67	45	25
	2	20	11	0
	3	52	19	32
	4	23	19	15
	5	63	38	78
	6	36	18	18
	5x	535	420	330
	35x	79	0	10
	40x	36	15	12
	44x	40	23	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7	27	0	15
	8	62	46	27
	9	104	74	32
	10	43	22	24
	11	14	0	0
	12	12	0	0
	13	0	0	0
	14	0	0	0
	15	20	0	0
	16	0	0	0
	17	29	18	17
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	124	72	71
	2	105	61	27
	3	100	101	79
	4	99	75	75
	5	40	23	32
	6	23	12	0
<i>Aeromonas caviae</i>	8	26	0	27

Fortsetzung Tabelle 1

Bakterienspezies	Stamm	Lipasekonzentration in µg/l		
		1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz
<i>Bacillus subtilis</i>	12	41	18	21
	13	73	28	42
	33x	30	10	19
	34x	30	0	30
<i>Proteus mirabilis</i>	8	48	22	19
	9	48	21	17
	10	48	27	n.b.
	11	47	19	18
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	0
	2	0	0	0
	4	0	0	0
	6	0	0	11
	8	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	37	16	0
	2	299	15	28
	3	53	61	38
	4	102	57	52
	5	25	34	20
	6	0	0	0
	6x	12	0	0
	7	13	11	0
	8	14	17	10
	9	0	0	0
	25x	13	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	0	0	0
	13	0	0	0
	15	0	0	0
	16	0	0	0

n.b. nicht bestimmt

Tabelle 2: Messwerte gewebseigener Lipasekonzentrationen in **Fleisch** mit dem Reflectoquant®
Lipase - Test

Produkte	Probennr.	Lipasekonzentration in µg/kg	Keimwachstum nach Direktausstrich auf Blutagar
Schweinefleisch	1	39	nein
	2	48	nein
	3	32	nein
	4	28	nein
	5	65	nein
	6	78	nein
	7	71	nein
	8	78	nein
	9	10	nein
	10	10	nein
	11	67	nein
	12	16	nein
Rindfleisch	1	56	nein
	2	67	nein
	3	99	nein
	4	78	nein
	5	136	nein
	6	81	nein
	7	95	nein
	8	73	nein
	9	131	nein
	10	59	nein
Hähnchenbrust	1	110	nein
	2	110	nein
	3	160	nein
	4	82	nein
	5	120	nein

Fortsetzung Tabelle 2

Produkte	Probennr.	Lipasekonzentration in µg/kg	Keimwachstum nach Direktausstrich auf Blutagar
Hähnchenbrust	6	74	nein
	7	134	nein
	8	96	nein
	9	122	nein
	10	79	nein
	11	147	nein
	12	84	nein
	13	136	nein
	14	277	nein
	15	285	nein
	16	201	nein
	17	104	nein
	18	151	nein
Hähnchenkeule	1	189	nein
	2	165	nein
	3	179	ja
	4	137	ja
	5	324	nein
	6	395	nein
	7	241	nein
	8	200	nein
	9	374	ja
	10	251	ja
	11	400	ja
Kaninchenfleisch	1	430	ja
	2	460	ja
	3	390	ja
	4	340	ja
	5	460	ja
	6	350	ja
	7	350	ja
	8	570	ja
	9	230	ja
	10	280	ja

Tabelle 3: Messwerte Lipasekonzentrationen in **Leber** mit dem Reflectoquant® Lipase - Test

Produkte	Probennr.	Lipasekonzentration in µg/kg	Keimwachstum nach Direktausstrich auf Blutagar
Schweineleber	1	187000	ja
	2	157000	ja
	3	170000	ja
	4	136000	ja
	5	121000	ja
	6	108000	ja
	7	101000	ja
	8	101000	ja
	9	152000	ja
	10	111000	ja
	11	71000	ja
	12	123000	ja
	13	102000	ja
	14	128000	ja
Putenleber	1	76500	ja
	2	45500	ja
	3	141500	ja
	4	35500	ja
	5	61000	ja
	6	24000	ja
	7	60500	ja
	8	49000	ja
	9	52500	ja
	10	41000	ja

Tabelle 4: Messwerte gewebeeigener Lipasekonzentrationen in **Fisch** mit dem Reflectoquant® Lipase - Test

Produkte	Probennr.	Lipasekonzentration in µg/kg	Keimwachstum nach Direktausstrich auf Blutagar
Kabeljau	1	242	ja
	2	182	ja
	3	228	ja
	4	410	ja
	5	96	ja
Forelle	1	1470	ja
	2	1040	ja
	3	1130	ja
	4	1435	ja
	5	1200	ja
Hering	1	1380	ja
	2	825	ja
	3	1080	ja
	4	900	ja
	5	870	ja
	6	930	ja

Tabelle 5: Messwerte Lipasekonzentrationen in **Fisch- und Wursterzeugnissen** mit dem Reflectoquant® Lipase - Test

Lebensmittelgruppe	Probennr.	Ausgewähltes Produkt	Lipasekonzentration in µg/kg	GKZ in KbE/g
Fischerzeugnis	1	Hering, heiß geräuchert	0	$< 10^2$
	2	Hering, heiß geräuchert	0	$< 10^2$
	3	Makrele, heiß geräuchert	0	$< 10^2$
	4	Forelle, heiß geräuchert	0	$< 10^2$
Rohwurst	1	Salami	212*	n.b.
	2	Ungarische Salami	215*	n.b.
	3	Knackwurst	96*	n.b.
	4	Knackwurst	133*	n.b.
	5	Schlackwurst	283*	n.b.
	6	Cervelatwurst	174*	n.b.

* Messwert muß mit Faktor 1,16 korrigiert werden (siehe Wiederfindung)

Fortsetzung Tabelle 5

Lebensmittelgruppe	Probennr.	Ausgewähltes Produkt	Lipase- konzentration in µg/kg	GKZ in KbE/g
Kochwurst	1	Blutwurst	0	$5,3 \times 10^2$
	2	Blutwurst	0	$3,5 \times 10^3$
	3	Sülze	0	$9,0 \times 10^2$
	4	Zungenwurst	0	$7,8 \times 10^3$
Brühwurst	1	Leberkäse	27	$< 10^2$
	2	Leberkäse	17	$< 10^2$
	3	Bierschinken	0	$< 10^2$
	4	Bierschinken	0	$< 10^2$
	5	Bierschinken	0	$< 10^2$
	6	Jagdwurst	0	$1,3 \times 10^3$
	7	Jagdwurst	0	$< 10^2$
	8	Bockwurst	0	$1,0 \times 10^2$
	9	Bockwurst	0	$< 10^2$
	10	Fleischwurst	0	$3,0 \times 10^3$
	11	Knoblauchbrühwurst	0	$1,0 \times 10^2$
	12	Kochsalami	0	$2,0 \times 10^2$
Erzeugnisse aus zerkleinertem Fleisch	1	Schweinehackfleisch	83	n.b.
	2	Schweinehackfleisch	173	n.b.
	1	Rinderhackfleisch	79	n.b.
	2	Rinderhackfleisch	89	n.b.

n.b. nicht bestimmt

Tabelle 6: Messwerte vor und nach der Filtration für Ringagardiffusionstest

Probennr.	Stamm	Lipasekonzentration in µg/l	
		vor der Filtration	nach der Filtration
1	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4	150	16
2	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4	128	11
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5x	480	10
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5x	430	15
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	46	0
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	38	0
1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 9	111	46
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 9	122	61
1	<i>Staphylococcus aureus</i> 4	31	26
2	<i>Staphylococcus aureus</i> 4	30	28
1	<i>Proteus mirabilis</i> 8	18	0
2	<i>Proteus mirabilis</i> 8	20	0
1	<i>Bacillus subtilis</i> 13	28	12
2	<i>Bacillus subtilis</i> 13	19	10

Tabelle 7: Messwerte **Thermostabilität** bakterieller Lipasen

Probennr.	Stamm	Lipasekonzentration in µg/l			
		vor Erhitzung	nach 5 minütiger Erhitzung bei		
		25 °C	60°C	70 °C	80 °C
1	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4	150	80	0	0
2	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4	128	83	0	0
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5x	480	518	102	0
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5x	430	382	108	0
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	46	34	12	0
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	38	39	14	0
1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 9	111	83	33	0
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 9	122	n.b.	24	0
1	<i>Staphylococcus aureus</i> 4	31	27	0	0
2	<i>Staphylococcus aureus</i> 4	30	27	10	0
1	<i>Proteus mirabilis</i> 8	18	0	0	0
2	<i>Proteus mirabilis</i> 8	20	10	0	0
1	<i>Bacillus subtilis</i> 13	28	0	0	0
2	<i>Bacillus subtilis</i> 13	19	0	0	0

n.b. nicht bestimmt

Tabelle 8: Messwerte **Thermostabilität** gewebeeigener Lipasen

Proben- nr.	Produkt	Lipasekonzentration in µg/kg				Keimwachstum nach Direktausstrich auf Blutagar
		vor Erhitzung	nach 5 minütiger Erhitzung bei			
			25 °C	50°C	60 °C	
1	Kabeljau	228	33	0	0	ja
2		410	13	0	0	ja
3		96	0	0	0	ja
1	Forelle	1040	87	37	0	ja
2		770	33	0	0	ja
3		1435	0	0	0	ja
1	Schweinefleisch	39	41	21	0	nein
2		64	47	24	0	nein
3		78	44	10	0	nein
1	Rindfleisch	56	29	13	0	nein
2		61	41	20	0	nein
1	Hähnchenfleisch	400	n.b.	43	0	nein
2		284	n.b.	32	0	nein
3		397	108	11	0	nein
1	Kaninchenfleisch	799	697	433	10	ja
2		858	740	442	24	ja
1	Putenleber	41650	5100	290	102	ja
2		44600	5500	374	135	ja
1	Schweineleber	216500	41500	1040	59	ja
2		199500	36500	930	49	ja

n.b. nicht bestimmt

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Fehlhaber möchte ich für die Überlassung der Thematik und die wissenschaftliche Betreuung danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. P. Braun, die durch ihre Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung sowie ihre Anregungen und Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt durch ihre moralische Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn Vet.-Ing. A. Richter möchte ich mich für seine Unterstützung bei der Realisierung der statistischen Auswertung bedanken.

Herrn Dr. W. Linxweiler und Herrn R. Olt von der Firma Merck KGaA danke ich für die fachliche Beratung und gute Kooperation im Zusammenhang mit dem Reflectoquant® Lipase – Test.

Gedankt sei an dieser Stelle auch allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig.

Ganz speziell möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, deren Unterstützung mir über viele Engpässe hinweggeholfen hat.

Die experimentellen Untersuchungen wurden von der Firma Merck KGaA unterstützt.